

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許力条約に基づいて公開された際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 7/08, 14/72, A61K 38/10, 38/16	A1	(11) 国際公開番号 WO00/18793 (43) 国際公開日 2000年4月6日(06.04.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05216 (22) 国際出願日 1999年9月24日(24.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/271626 1998年9月25日(25.09.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 北田千恵子(KITADA, Chieko)(JP/JP) 〒590-0073 大阪府堺市南向陽町1丁2番8号 Osaka, (JP) 日沼州司(HINUMA, Shuji)(JP/JP) 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHI, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーロシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PEPTIDE DERIVATIVE (54) 発明の名称 ペプチド誘導体 (57) Abstract A novel peptide which is recognized as a ligand by a G protein-coupled receptor protein. This peptide is usable in: (1) developing a receptor-binding assay system with the use of an expression system of a recombinant receptor protein and screening candidates for drugs; and (2) developing drugs such as central function controlling agents, circulatory function controlling agents, heart function controlling agents, immune function controlling agents, digestive function controlling agents, metabolic function controlling agents or reproductive function controlling agents.		

(57)要約

本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識する新規ペプチドに関する。

本発明のペプチドは、①組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、②中枢機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤または生殖器機能調節剤などの医薬の開発等に用いることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EES	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モロッコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GN	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CN	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CR	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CJ	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CL	チリ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KR	朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ		韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

ペプチド誘導体

技術分野

- 5 本発明は、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるAPJに対するリガンド活性を有する新規ペプチドおよびその用途などに関する。

背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行い、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと総称される。

- 15 このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターとの相互作用を通じて生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節などの生体にとって重要な機能調節が行われている。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質に対するレセプター蛋白質が存在し、その機能調節に重要な役割を
20 果たしていることがわかっているが、未知の作用物質（ホルモンや神経伝達物質など）およびそれに対するレセプターが存在するかどうかについては未だ不明なことが多い。

- 近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がその構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション
25 (Polymerase Chain Reaction：以下、PCRと略称する) 法によって新規レセプター蛋白質をコードするDNAを探索する方法が行われるようになり、数多

くの、リガンドが不明ないわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質がクローニングされている(Libert, F., et al. Science, 244, 569-572, 1989, Welch, S.K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 606-613, 1995, Marchese, A., et al., Genomics, 23, 609-618, 1994, Marchese, A., Genomics, 5 29, 335-344, 1995)。また、ゲノムDNAあるいはcDNAのランダムな配列決定によっても、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質が次々と見出されている(Nomura, N., et al., DNA Research 1 巻、27-35 頁、1994 年)。これらのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する一般的な手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一次構造上の類似性から推定する
10 しかなかった。しかし、多くのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質は既知のレセプターとのホモロジーが低いものが多く、実際は既知リガンドのレセプターサブタイプである場合を除いては一次構造上の類似性だけでそのリガンドを推定することは困難であった。一方、遺伝子解析から多くのオーファンG蛋白質共役型レセプターがみつまっていることから対応する未知のリガンド
15 がまだ数多く存在していることが推定されているが、これまで実際にオーファンG蛋白質共役型レセプターのリガンドを同定した例は数少ない。

最近、動物細胞にオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを導入し、新規オピオイドペプチドを探索した例が報告されている(Reinsheid, R. K. et al., Science, 270 巻、792-794 頁、1995 年、Menular, J.-C.,
20 et al., Nature 377 巻、532-535 頁、1995 年)。しかしこの場合は既知G蛋白質共役型レセプター蛋白質との類似性や組織分布から、容易にリガンドはオピオイドペプチドのファミリーに属することが予想されていた。オピオイドレセプターを介して生体に作用する物質の研究・開発の歴史は長く、種々のアンタゴニスト・アゴニストが開発されていた。そこで人為的に合成した化合物群の
25 中からこの受容体に対するアゴニストを見出し、それをプローブとして受容体cDNA導入細胞における受容体の発現を検証した後に、アゴニストと同じ様

な細胞内情報伝達系の活性化物質を探索し、これを精製し、リガンドの構造を決定している。

またカタツムリのオーファンG蛋白質共役型レセプター（GRL104）をコードするcDNAをCHO細胞に導入してレセプター発現細胞での特異的な細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を指標として新規生理活性ペプチドを同定した例が報告されているが（Cox, K.J.A., et al., J. Neurosci., 17(4), 1197-1205, 1997）、この新規生理活性ペプチドは既知の leucokinin と高い相同性を有し、GRL104は既知の leucokinin との反応性もあった。このようにオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の中でリガンドがおおよそ推定されうるものはほとんどなく、特に、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーと類似性が低い場合、リガンドに関する情報はほとんどなく、リガンドを推定することは困難であった。

オーファンG蛋白質共役型レセプターとして報告されているものの一つにAPJがある（O'Dowd, B.F., et al., Gene, 436, 355-359, 1993）。APJはアンギオテンシンレセプター（AT1）と低いホモロジーがある。APJに対する天然のリガンドおよびその部分ペプチドは、WO 99/33976号（特願平10-220853号）に記載されているが、天然型のリガンドに人工的に修飾を加えた修飾体（例えば天然型のリガンドの1個ないし数個の構成アミノ酸を他のアミノ酸で置換したもの、天然型のリガンドの1個ないし数個の構成アミノ酸の側鎖を適当な置換基で置換したものなど）については、全く知られていない。

発明の開示

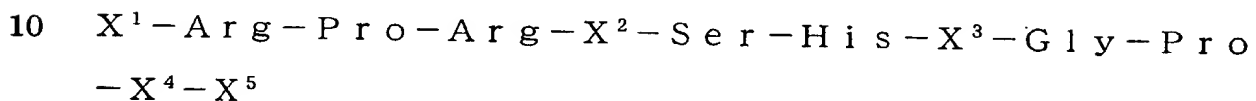
中枢神経系、循環器系、生殖器系、免疫系、消化器等で発現しているオーファンG蛋白質共役型レセプターであるAPJに対する天然型のリガンドに人工的に修飾を加えたペプチドは、天然型のリガントに比べ、医薬などとしてより

有用であると考えられるが、これまでに天然型のリガンドに比べ、医薬などとしてより有用なペプチドの構造および機能については明らかにされていない。

本発明者らは、かかる課題に基づいて、該天然型リガンドの修飾体であるペプチドと上記レセプター蛋白質との結合性の変化を指標とし、種々の新規ペプチドを合成し、天然型リガンドの活性部位を予想・特定することにより、医薬としてより有用な天然型リガンドの修飾体を見いだした。

すなわち、本発明は、

(1) 式



[式中、 X^1 は水素原子またはそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 X^2 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基を示し、 X^3 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、側鎖が置換されていてもよい芳香性アミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基を示し、 X^4 は結合手または側鎖が置換されていてもよい中性または芳香性アミノ酸残基を示し、 X^5 は①側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、②水酸基または③側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基と側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基が結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体を示し、式中の $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ 、 $-\text{Ser}-\text{His}-$ または $-\text{Gly}-\text{Pro}-$ 中の各アミノ酸残基の側鎖は置換されていてもよい。但し、 X^2 がLeuを、 X^3 がLysを、 X^4 がMetを示し、かつ X^5 が①Proまたは②Pro-Pheを示し、式中の $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ が

無置換の $-Arg-Pro-Arg-$ を、 $-Ser-His-$ が無置換の $-Ser-His-$ を、かつ $-Gly-Pro-$ が無置換の $-Gly-Pro-$ を示す場合を除く。] で表されるペプチドまたはそのエステル（以下、本発明のペプチドと略記する場合がある）またはそれらの塩、

- 5 (2) X^1 が側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基である上記 (1) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(3) X^1 が置換されていてもよい $pGlu$ または側鎖が置換されていてもよい Gln である上記 (1) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

- 10 (4) X^1 が 式 Y^1-Y^2 (式中、 Y^1 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい 1 ないし 17 個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 Y^2 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい 1 ないし 8 個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す) で表される上記 (1) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

- 15 (5) Y^2 が ① 式 $B^1-B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、 B^1 ないし B^8 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、② 式 $B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、③ 式 $B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、④ 式 $B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑤ 式 $B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑥ 式 $B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑦ 式 B^7-B^8 (式中、各記号は上記と同意義を示す) または⑧ 式 B^8 (式中、 B^8 は上記と同意義を示す) で表されるペプチド鎖である上記 (4) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

- 25 (6) B^1 が側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である上記 (5) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(7) B¹が置換されていてもよいGlyである上記(6)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(8) B²、B³およびB⁴がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である上記(5)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(9) B⁵が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である上記(5)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(10) (10) B⁶およびB⁷がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である上記(5)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(11) B⁸が側鎖が置換されていてもよいGlnである上記(5)記載のペプチド、

(12) Y¹が(a) 式 $A^1-A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、A¹ないしA¹⁷はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、(b) 式 $A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(c) 式 $A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(d) 式 $A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(e) 式 $A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(f) 式 $A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(g) 式 $A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(h) 式 $A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}$

- $A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(i) 式 $A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(j) 式 $A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(k) 式 $A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(l) 式 $A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(m) 式 $A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(n) 式 $A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(o) 式 $A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(p) 式 $A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す) または (q) A^{17} (A^{17} は前記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖である上記 (4) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、
- (13) A^1 が芳香性の側鎖を有するアミノ酸残基である上記 (12) 記載のアミノ酸残基またはペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、
- (14) A^2 および A^3 が側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、
- (15) A^4 が側鎖が置換されていてもよい中性または塩基性—L—アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、
- (16) A^5 が側鎖が置換されていてもよい Pro である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、
- (17) A^6 および A^9 がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、
- (18) A^7 および A^{10} がそれぞれ同一または異なって、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(19) A⁸がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である上記(12)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(20) A⁸がSer、ProまたはHypである上記(12)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

5 (21) A¹⁰がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である上記(12)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(22) A¹¹ないしA¹⁴がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていて
もよい中性アミノ酸残基である上記(12)記載のペプチドまたはそのエス
テルまたはそれらの塩、

10 (23) A¹⁵が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である上記(12)記載
のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(24) A¹⁵がTrpである上記(23)記載のペプチドまたはそのエステルま
たはそれらの塩、

(25) A¹⁶およびA¹⁷がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていて
15 もよい中性アミノ酸残基である上記(12)記載のアミノ酸残基またはペプ
チドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(26) 上記(1)記載のペプチドまたはそのエステルまたはその塩を含有し
てなる医薬、

(27) 中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調
20 節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤または生殖器機能調節剤である上記

(26)記載の医薬、および

(28) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその
塩の作用剤である上記(26)記載の医薬などに関する。

さらに、本発明は、

25 (29) 痴呆、鬱病、多動児(微細脳障害)症候群、意識障害、不安障害、精
神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害、過食症、多食症、高コレステロー

- ル血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、糖尿病、癌、肺炎、腎疾患、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫、乳汁分泌不全またはエイズなどの疾病の治療・予防剤である上記（26）項記載の医薬などを提供するものである。

図面の簡単な説明

- 図1は実施例3、4のペプチドおよび実施例1の対応天然型ペプチドの Acidification Rate の変化量を示す図を示す。

図中、▲-▲は実施例3で得られたペプチドの Acidification Rate の変化量、□-□は実施例4で得られたペプチドの Acidification Rate の変化量、●-●は実施例1の対応天然型ペプチドの Acidification Rate の変化量を示す。

15 発明を実施するための最良の形態

- 本発明においてアミノ酸残基とは、アミノ酸が水分子を失ってペプチド結合を形成し、タンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の構造をいう。例えば、 α -アミノ酸残基とは α -アミノ酸 ($H_2NC(R^0)(R^1)COOH$: R^0 および R^1 はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成し、タンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の $-NHC(R^0)(R^1)CO-$ の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基は $H_2NC(R^0)(R^1)CO-$ 、C末端のアミノ酸残基は $-NHC(R^0)(R^1)COOH$ で示される。また、 β -アミノ酸 ($H_2NC(R^0)(R^1)C(R^2)(R^3)COOH$: R^0 、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の-

NHC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)CO-の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基は H₂ NC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)CO-、C末端のアミノ酸残基は -NHC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)COOH で示される。また、γ-アミノ酸 (H₂ NC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)COOH : R⁰, R¹, R², R³, R⁴および R⁵はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の -NHC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)CO-の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基は H₂ NC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)CO-、C末端のアミノ酸残基は -NHC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)COOH で示される。さらに、ε-アミノ酸 (H₂ NC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)C(R⁶)(R⁷)C(R⁸)(R⁹)COOH : R⁰, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸および R⁹はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の -NHC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)C(R⁶)(R⁷)C(R⁸)(R⁹)CO-の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基は H₂ NC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)C(R⁶)(R⁷)C(R⁸)(R⁹)CO-、C末端のアミノ酸残基は -NHC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)C(R⁶)(R⁷)C(R⁸)(R⁹)COOH で示される。

本明細書において、アミノ酸としては、天然または非天然のアミノ酸であって、D-体またはL-体のいずれでもよく、α-、β-、γ-、ε-型のいずれのものでもよい。

α-アミノ酸、β-アミノ酸、γ-アミノ酸、ε-アミノ酸の側鎖を形成する基としては、例えば(1)C₁₋₆アルキル基 (例、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチルなど、好ましくはC₁₋₃アルキルなど)、(2)シアノ基、(3)ハロゲン (例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、(4)ヒドロキシ-C₁₋₆アルキル基 (例、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチルなど)、(5)C₁₋₆アルコ

- キシ基（例、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブ
トキシ、*tert*-ブトキシなど、好ましくは C_{1-3} アルコキシなど）、(6) C_{1-6}
アルコキシカルボニル基（例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル
、イソプロポキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニルなど、好ましく
5 は C_{1-3} アルコキシカルボニルなど）、(7) C_{1-4} アシル基（例、ホルミル、ア
セチル、プロピオニル、ブチリルなどのホルミルおよび C_{2-4} アルカノイルなど
）、(8)ヒドロキシ基、(9)式： $-S(O)_a-R^{21}$ （式中、*a*は0～2の整数を
、 R^{21} は C_{1-6} アルキル（具体例は、上記と同様のものが挙げられる）を示す
）で表わされる基（例、メチルチオ、メタンスルフィニル、メタンスルホニル
10 、エチルチオ、エタンスルフィニル、エタンスルホニルなど）、(10)ベンジルオ
キシカルボニル、(11)トシル基、(12)カルバモイル基、(13)メルカプト基、(14)
アミノ基、(15)スルホ基、(16)ホスホノ基、(17)ホスホ基、(18)カルボキシ
基、(19)テトラゾリル基、(20)アミノ- C_{1-6} アルキル基（例、アミノメチル
、アミノエチルなど）、(21)アミノアリル基、(22)チアゾリル基、(23)チエニ
15 基、(24)オキサゾリル基、(25)フリル基、(26)ピラニル基、(27)ピリジル基、(28)
ピラジリル基、(29)ピラジニル基、(30)ピリミジニル基、(31)ピリダジニル基、(32)
インドリル基、(33)インドジニル基、(34)イソインドリル基、(35)ピロリル基、
(36)イミダゾリル基、(37)イソチアゾリル基、(38)ピラゾリル基、(39)クロメ
ニル基、(40)プリニル基、(41)キノリジニル基、(42)キノリル基、(43)イソキノ
20 リル基、(44)キナゾリニル基、(45)キノキサリニル基、(46)シンノリニル基、(47)
モルホリニル基、(48)ベンゾチエニル基、(49)ベンゾフラニル基、(50)ベンズ
イミダゾリル、(51)ベンズイミダゾリル基、(52) C_{3-8} シクロアルキル基、(53)
上記(2)、(3)、(5)から(17)、(20)から(52)に記載の置換基で置換された C_{1-4} ア
ルキル基、(54)上記(2)、(3)、(5)から(17)、(20)から(52)に記載の置換基で置
25 換されたホルミル、 C_{2-4} アルカノイルなどの C_{1-4} アシル基、(55)上記(1)から
(52)の記載の置換基で置換されたフェニルなどの C_{6-10} アリール基（メシチル

、トリル、キシリル、スチレニルなど)、(56) 上記(1)から(52)の記載の置換基で置換されたベンジルなどのC₇₋₁₅アラルキル基(メチルベンジル、メトキシベンジルなど)、(57)C₇₋₁₅アラルキル基(ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリル、ナフチルメチルなど)、(58)C₆₋₁₀アリール基(フェニル、ナフチル、インデニルなど)、および(59)水素原子などがあげられる。

また、アミノ酸残基を形成する側鎖と窒素原子が結合し、環を形成してもよく(例、プロリンなど)、2つの側鎖が結合し環を形成してもよい(例、3-アミノノルボルナンカルボン酸など)。

α -アミノ酸の例としては、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミン、プロリン、ピペコリン酸、ノルロイシン、 γ -メチルロイシン、tert-ロイシン、ノルバリン、ホモアルギニン、ホモセリン、 α -アミノイソ酪酸、 α -アミノ酪酸、オルニチン、 α -アミノアジピン酸、フェニルグリシン、チエニルグリシン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、オクタヒドロインドール-2-カルボン酸、アダマンチルアラニン、ベンゾチエニルアラニン、ピリジルアラニン、ピペリジルアラニン、ピラジルアラニン、キノリルアラニン、チアゾリルアラニン、ホモシステイン、ホモフェニルアラニン、シトルリン、ホモシトルリン、オキシプロリン(ヒドロキシプロリン)、 α 、 β -ジアミノプロピオン酸、 α 、 γ -ジアミノ酪酸、アミノマロン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、ペニシラミン、シクロロイシン、2-アミノ-4-ペンテン酸などがあげられる。

β -アミノ酸の例としては、例えば、 β -アラニン、 β -アミノ酪酸、イソアスパラギン、3-アミノアジピン酸、3-アミノフェニルプロピオン酸、3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸、3-アミノノルボルナンカルボン酸、3-アミノ

ビスクロヘプタンカルボン酸などがあげられる。

γ -アミノ酸の例としては、例えば、 γ -アミノ酪酸、イソグルタミン、スタチン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-シクロヘキシルペンタン酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、6-アミノペニシラン酸、3-アミノアダマンタン-1-カルボン酸などがあげられる。

ϵ -アミノ酸の例としては、例えば、 ϵ -アミノカプロン酸、4-アミノメチルシクロヘキサンカルボン酸などがあげられる。

該天然のアミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、シスチン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミン、プロリン、オルニチン、シトルリンなどが挙げられる。

非天然のアミノ酸としては、ノルロイシン、 γ -メチルロイシン、tert-ロイシン、ノルバリン、ホモアルギニン、ホモセリン、アミノイソ酪酸、アミノアジピン酸（例、 α -アミノアジピン酸）、フェニルグリシン、チエニルグリシン、シクロヘキシルグリシン、アミノ酪酸、 β -アラニン、シクロヘキシルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、アダマンチルアラニン、ベンゾチエニルアラニン、ピリジルアラニン、ピペリジルアラニン、ピラジルアラニン、キノリルアラニン、チアゾリルアラニン、イソアスパラギン、イソグルタミン、ホモシステイン、ホモフェニルアラニン、ホモシトルリン、オキシプロリン（ヒドロキシプロリン）、ジアミノプロピオン酸、ジアミノ酪酸、アミノ安息香酸、前記天然アミノ酸、非天然アミノ酸のN-メチル化体などが挙げられる。

これらのアミノ酸残基の側鎖に置換していてもよい置換基の例としては、(1) C_{1-6} アルキル基（例、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチルなど、

- 好ましくは C_{1-3} アルキルなど)、(2)シアノ基、(3)ハロゲン(例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、(4)ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル基(例、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチルなど)、(5) C_{1-6} アルコキシ基(例、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、*tert*-ブトキシなど、好ましくは C_{1-3} アルコキシなど)、(6) C_{1-6} アルコキシカルボニル基(例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニルなど、好ましくは C_{1-3} アルコキシカルボニルなど)、(7) C_{1-4} アシル基(例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリルなどのホルミルおよび C_{2-4} アルカノイルなど)、(8)ヒドロキシ基、(9)
- 10 式： $-S(O)_a-R^{21}$ (式中、 a は0~2の整数を、 R^{21} は C_{1-6} アルキル(具体例は、上記と同様のものが挙げられる)を示す)で表わされる基(例、メチルチオ、メタンスルフィニル、メタンスルホニル、エチルチオ、エタンスルフィニル、エタンスルホニルなど)、(10)ベンジロキシカルボニル、(11)トシル基、(12)カルバモイル基、(13)メルカプト基、(14)アミノ基、(15)スルホ
- 15 基、(16)ホスホノ基、(17)ホスホ基、(18)カルボキシ基、(19)テトラゾリル基、(20)アミノ- C_{1-6} アルキル基(例、アミノメチル、アミノエチルなど)、(21)アミノアリル基、(22)チアゾリル基、(23)チエニル基、(24)オキサゾリル基、(25)フリル基、(26)ピラニル基、(27)ピリジル基、(28)ピラジル基、(29)ピラジニル基、(30)ピリミジニル基、(31)ピリダジニル基、(32)インドリル基、(33)
- 20 インドジニル基、(34)イソインドリル基、(35)ピロリル基、(36)イミダゾリル基、(37)イソチアゾリル基、(38)ピラゾリル基、(39)クロメニル基、(40)プリニル基、(41)キノリジニル基、(42)キノリル基、(43)イソキノリル基、(44)キナゾリニル基、(45)キノキサリニル基、(46)シンノリニル基、(47)モルホリニル基、(48)ベンゾチエニル基、(49)ベンゾフラニル基、(50)ベンズイミダゾリル、(51)
- 25 ベンズイミダゾリル基、(52) C_{3-8} シクロアルキル基、(53)オキソ基、(54)上記(2)、(3)、(5)から(19)、(22)から(52)に記載の置換基で置換された C_{1-4} アルキ

ル基、(55) 上記(2)、(3)、(5)から(19)、(22)から(52)に記載の置換基で置換されたホルミル、 C_{2-4} アルカノイルなどの C_{1-4} アシル基、(56)上記(1)から(52)の記載の置換基で置換されたフェニルなどの C_{6-10} アリール基（メシチル、トリル、キシリル、スチレニルなど）、(57) 上記(1)から(52)の記載の置換基で置換されたベンジルなどの C_{7-15} アラルキル基（メチルベンジル、メトキシベンジルなど）、(58) C_{7-15} アラルキル基（ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリル、ナフチルメチルなど）、(59) C_{6-10} アリール基（フェニル、ナフチル、インデニルなど）などがあげられる。

中性の置換基としては、(1) C_{1-6} アルキル基（例、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチルなど、好ましくは C_{1-3} アルキルなど）、(2)シアノ基、(3)ハロゲン（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）、(4)ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル基（例、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチルなど）、(5)ヒドロキシ基、(6)カルバモイル基、(7)メルカプト基、(8)式： $-S(O)_a-R^{21}$ （式中の各記号は前記と同意義）で表される基、(9) C_{6-10} アリール基（例フェニル、ナフチル、インデニル、クロメニルなど）、(10)チエニル基、(11)オキサゾリル基、(12)フリル基、(13)インドリル基、(14)インドリジニル基、(15)イソインドリル基、(16) C_{3-8} シクロアルキル基、(17)オキソ基、(18)上記(2)、(3)、(5)から(16)に記載の置換基で置換された C_{1-6} アルキル、(19) 上記(1)から(16)に記載の置換基で置換されたフェニル、ナフチルなどの C_{6-10} アリール基（メシチル、トリル、キシリル、スチレニルなど）、(20) 上記(1)から(16)に記載の置換基で置換されたベンジルなどの C_{7-15} アラルキル基（メチルベンジル、メトキシベンジルなど）などがあげられる。

酸性の置換基としては、それぞれカルボキシル基、スルホ基、テトラゾリル基等で置換された C_{1-4} アルキル基、フェニル、ナフチルなどの C_{6-10} アリール基もしくはベンジルなどの C_{7-15} アラルキル基、カルボキシル基などがあげ

られる。

塩基性の置換基としては、(1)アミノ-C₁₋₆アルキル基（アミノメチル、アミノエチルなど）、(2)アミノアリル基、(3)ピリジル基、(4)ピラジル基、(5)ピラジニル基、(6)ピリダジニル基、(7)イミダゾリル基、(8)ピラゾリル基、(9)ピラゾリル基、(10)モルホリニル基、(11)アミノ基、(12)上記(3)から(10)に記載の置換基で置換されたC₁₋₄アルキル基、(13)上記(1)から(11)に記載の置換基で置換されたベンジルなどのC₇₋₁₅アラルキル基、(14)上記(1)から(11)に記載の置換基で置換されたフェニル、ナフチルなどのC₆₋₁₀アリール基などがあげられる。

10 本明細書において、酸性アミノ酸としては、具体的には、たとえば、側鎖にカルボキシル基、スルホ基、テトラゾリル基のような酸性基を有するアミノ酸があげられる。その具体例としては、グルタミン酸、ピログルタミン酸、アスパラギン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、3-(5-テトラゾリル)アラニン、2-アミノ-4-(5-テトラゾリル)酪酸などがあげられる。

15 本明細書において、塩基性アミノ酸としては、たとえば、ヒスチジン、アルギニン、オルチニン、リジン、ジアミノプロピオン酸、ジアミノ酪酸、ホモアルギニンなどがあげられる。側鎖が置換された塩基性アミノ酸としては、具体的には、たとえば、N^α-アセチルアルギニン、N^ε-トシルアルギニン、N^ε-アセチルリジン、N^ε-メチルリジン、N^ε-トシルリジンなどがあげられる。

20 。

本明細書において、中性アミノ酸としては、具体的には、たとえば、アラニン、バリン、ノルバリン、ロイシン、イソロイシン、アロイソロイシン、ノルロイシン、ターシャリーロイシン、ガンマメチルロイシン、プロリン、フェニルグリシン、フェニルアラニン、グルタミン、アスパラギン、セリン、スレオニン、グリシン、システイン、メチオニン、トリプトファン、オキシプロリン（ヒドロキシプロリン）、シクロヘキシルアラニン、などのアミノ酸があげら

25

れる。側鎖が置換された中性アミノ酸としては、具体的には、たとえば、ピフェニルアラニンなどがあげられる。

本明細書において、芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基としては、具体的には、たとえば、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、2-チエニルアラニン、ヒスチジン、ピリジルアラニン（2-ピリジルアラニン）、O-メチルチロシンなどがあげられる。側鎖が置換された芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基としては、具体的には、たとえば、3-ヨウドチロシン、p-ホスホノメチルフェニルアラニン、O-ホスホチロシンなどがあげられる。

- 10 本明細書において、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基としては、例えば、セリン、スレオニン、チロシン、オキシプロリン（ヒドロキシプロリン）などがあげられる。

- 本明細書におけるペプチドおよびペプチド鎖はペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。本
- 15 発明のペプチドおよびペプチド鎖はC末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、フェニル、α-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル、もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが挙げられる。
- 20

- 本発明のペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを
- 25 有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記した

C末端のエステルなどが用いられる。

また、本発明のペプチドまたはペプチド鎖には、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が置換基（例えば、①ホルミル、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基、グアニジノアセチル、チエニルアクリリル、ピリジルアセチルなどのC₁₋₈アシル基、②メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどのC₁₋₆アルキル基、③フェニル、ナフチルなどC₆₋₁₀アリール基またはベンジル、フェネチルなどのC₇₋₁₆アラルキル基、④トシル基（p-トルエンスルフォニル基）、⑤ベンジルオキシカルボニル基、⑥式： $-S(O)_a-R^{22}$ （式中、aは0～2の整数を、R²²はC₁₋₆アルキル（具体例は、上記と同様のものがあげられる）を示す）で表される基（例、メチルチオ、メタンスルフィニル、メタンスルホニル、エチルチオ、エタンスルフィニル、エタンスルホニルなど）、⑦t-ブトキシカルボニル基、⑧N-9-フルオレニルメトキシカルボニル基など）で置換されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾリル基、インドリル基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

20 上記の式

$X^1-Arg-Pro-Arg-X^2-Ser-His-X^3-Gly-Pro-X^4-X^5$ 中、 $-Arg-Pro-Arg-$ 、 $-Ser-His-$ および $-Gly-Pro-$ 中の各アミノ酸残基の側鎖は置換されていてもよく、置換基としては、上記の置換基などがあげられる。

25 本明細書において、X¹は「水素原子またはそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸からなるアミノ酸残基また

はペプチド鎖」を示す。

該「側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸」における置換基としては、例えば、上記の「アミノ酸残基の側鎖に置換していてもよい置換基」と同様のものなどがあげられる。

- 5 X^1 が「側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基」を示すときの好ましい例としては、例えば、置換されていてもよいピログルタミン酸または側鎖が置換されていてもよいグルタミンなどがあげられ、より好ましくは、ピログルタミン酸またはグルタミンなどがあげられる。

- 10 該「側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基」、「置換されていてもよいピログルタミン酸」、「側鎖が置換されていてもよいグルタミン」におけるアミノ酸残基の置換基としては、例えば、上記の「アミノ酸残基の側鎖に置換していてもよい置換基」と同様のものなどがあげられる。

また、「置換されていてもよいピログルタミン酸」の好ましい置換基としては、ベンジルオキシカルボニル基などがあげられる。

- 15 X^1 が「それぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい2ないし25個のアミノ酸からなるペプチド鎖」を示すときの具体例としては、例えば、式
 $Y^1 - Y^2$ （式中、 Y^1 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし17個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、
20 Y^2 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし8個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す）で表されるペプチドなどがあげられる。

- 25 上記 Y^1 および Y^2 で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖中のアミノ酸残基の側鎖の置換基としては、例えば、上記の「アミノ酸残基の側鎖に置換していてもよい置換基」と同様のものなどがあげられる。

上記 Y^1 としての具体例としては、例えば、

(a) 式 $A^1-A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、 A^1 ないし A^{17} はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、

(b) 式 $A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(c) 式 $A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(d) 式 $A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(e) 式 $A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(f) 式 $A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(g) 式 $A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(h) 式 $A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(i) 式 $A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(j) 式 $A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(k) 式 $A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(l) 式 $A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(m) 式 $A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)

)、

(n) 式 $A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(o) 式 $A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(p) 式 $A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す) または

- 5 (q) A^{17} (A^{17} は前記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖などがあげられる。

上記 A^1 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、芳香性の側鎖を有するアミノ酸残基、より好ましくは、芳香性の側鎖を有する L-アミノ酸残基、さらに好ましくは L-チロシンなどを示す。

- 10 上記 A^2 および A^3 はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい L-中性アミノ酸残基、さらに好ましくは A^2 としては L-ロイシンなど、 A^3 としては L-バリンなどがあげられる。

- 15 上記 A^4 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性または塩基性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい L-中性または L-塩基性アミノ酸残基、さらに好ましくは L-リジンまたは N^ε-アセチルリジンなどを示す。

- 20 上記 A^5 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、置換されていてもよい L-プロリン、さらに好ましくは、L-プロリンなどを示す。 上記 A^6 および A^9 はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい L-塩基性アミノ酸残基、さらに好ましくは L-アルギニンなどを示す。

上記 A^7 および A^{10} は、それぞれ同一または異なって側鎖が置換されていても

よいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基などを示す。

A⁷としては、置換されていてもよいグリシン、特にグリシンなどが好ましく用いられる。

- 5 上記A⁸は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、L-プロリンやヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基、より好ましくは、L-セリン、L-プロリンまたはオキシプロリン（ヒドロキシプロリン）などを示す。

- 10 上記A¹⁰として好ましくは、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくはL-セリン、L-スレオニン、L-アスパラギンなどを示す。

- 15 上記A¹¹ないしA¹⁴はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、A¹¹としてはグリシン、A¹²としてはL-プロリン、A¹³としてはグリシン、A¹⁴としてはL-アラニン、L-プロリンなどがあげられる。

上記A¹⁵は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基、より好ましくは、芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、さらに好ましくはL-トリプトファンなどを示す。

- 20 上記A¹⁶は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、カルバモイル基を持つ中性L-アミノ酸残基、さらに好ましくはL-グルタミンを示す。

カルバモイル基を持つ中性L-アミノ酸残基としては、例えばL-グルタミン、L-アスパラギンなどがあげられる。

- 25 A¹⁷は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、グリシンなど

を示す。

上記 Y^2 としての具体例としては、例えば、

- ① 式 $B^1-B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、 B^1 ないし B^8 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、
- 5 ② 式 $B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ③ 式 $B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ④ 式 $B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- 10 ⑤ 式 $B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ⑥ 式 $B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ⑦ 式 B^7-B^8 (式中、各記号は上記と同意義を示す) または
- ⑧ 式 B^8 (B^8 は上記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖などがあげられる。

- 15 上記 B^1 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性L-アミノ酸残基、さらに好ましくは、置換されていてもよいグリシン、最も好ましくは、グリシンなどを示す。

- 上記 B^2 ないし B^4 はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性
- 20 アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性L-アミノ酸残基、さらに好ましくは、 B^2 としてはL-アルギニン、 B^3 としてはL-アルギニン、 B^4 としては、L-リジンなどを示す。

- 上記 B^5 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、
- 25 芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基、より好ましくは、芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、さらに好ましくは、L-フェニルアラニンなどを示す

。

- 上記B⁶およびB⁷はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性L-アミノ酸残基、さらに好ましくは、L-アルギニンなどを示す。

上記B⁸は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよいグルタミン、より好ましくは、L-グルタミンなどを示す。

Y¹とY²の組み合わせとしては、

- 10 上記(a)で表される式+上記①で表される式で表される場合（即ちX¹が、A¹—A²—A³—A⁴—A⁵—A⁶—A⁷—A⁸—A⁹—A¹⁰—A¹¹—A¹²—A¹³—A¹⁴—A¹⁵—A¹⁶—A¹⁷—B¹—B²—B³—B⁴—B⁵—B⁶—B⁷—B⁸で表される場合：以下の組み合わせの説明においては省略する）、

上記(a)で表される式+上記②で表される式で表される場合、

- 15 上記(a)で表される式+上記③で表される式で表される場合、

上記(a)で表される式+上記④で表される式で表される場合、

上記(a)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、

上記(a)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、

上記(a)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、

- 20 上記(a)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、

上記(b)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(b)で表される式+上記②で表される式で表される場合、

上記(b)で表される式+上記③で表される式で表される場合、

上記(b)で表される式+上記④で表される式で表される場合、

- 25 上記(b)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、

上記(b)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、

- 上記(b)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(b)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(c)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(c)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
5 上記(c)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(c)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(c)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(c)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(c)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
10 上記(c)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(d)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(d)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(d)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(d)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
15 上記(d)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(d)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(d)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(d)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(e)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
20 上記(e)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(e)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(e)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(e)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(e)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
25 上記(e)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(e)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、

- 上記(f)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(f)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(f)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(f)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
5 上記(f)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(f)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(f)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(f)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(g)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
10 上記(g)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(g)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(g)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(g)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(g)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
15 上記(g)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(g)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(h)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(h)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(h)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
20 上記(h)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(h)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(h)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(h)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(h)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
25 上記(i)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(i)で表される式+上記②で表される式で表される場合、

- 上記(i)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(i)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(i)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(i)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
5 上記(i)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(i)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(j)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(j)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(j)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
10 上記(j)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(j)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(j)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(j)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(j)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
15 上記(k)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(k)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(k)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(k)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(k)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
20 上記(k)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(k)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(k)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(l)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(l)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
25 上記(l)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(l)で表される式+上記④で表される式で表される場合、

- 上記(l)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(l)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(l)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(l)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
5 上記(m)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(m)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(m)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(m)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(m)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
10 上記(m)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(m)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
上記(m)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(n)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(n)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
15 上記(n)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(n)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
上記(n)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(n)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、
上記(n)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、
20 上記(n)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、
上記(o)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
上記(o)で表される式+上記②で表される式で表される場合、
上記(o)で表される式+上記③で表される式で表される場合、
上記(o)で表される式+上記④で表される式で表される場合、
25 上記(o)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、
上記(o)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、

上記(o)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、

上記(o)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、

上記(p)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(p)で表される式+上記②で表される式で表される場合、

5 上記(p)で表される式+上記③で表される式で表される場合、

上記(p)で表される式+上記④で表される式で表される場合、

上記(p)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、

上記(p)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、

上記(p)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、

10 上記(p)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合、

上記(q)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(q)で表される式+上記②で表される式で表される場合、

上記(q)で表される式+上記③で表される式で表される場合、

上記(q)で表される式+上記④で表される式で表される場合、

15 上記(q)で表される式+上記⑤で表される式で表される場合、

上記(q)で表される式+上記⑥で表される式で表される場合、

上記(q)で表される式+上記⑦で表される式で表される場合、および

上記(q)で表される式+上記⑧で表される式で表される場合があげられるが、
なかでも、

20 上記(a)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(b)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(c)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(d)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(e)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

25 上記(f)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

上記(g)で表される式+上記①で表される式で表される場合、

- 上記(h)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 上記(i)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 上記(j)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 上記(k)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 5 上記(l)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 上記(m)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 上記(n)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 上記(o)で表される式+上記①で表される式で表される場合、
 上記(p)で表される式+上記①で表される式で表される場合、および
 10 上記(q)で表される式+上記①で表される式で表される場合が好ましい。

なかでも、上記(a)で表される式+上記①で表される式で表される場合および
 上記(b)で表される式+上記①で表される式で表される場合がより好ましい例と
 してあげられる。

- 上記(a)で表される式+上記①で表される式で表される場合および
 15 上記(b)で表される式+上記①で表される式で表される場合の更に好ましい具体
 例を以下に示す。

- 上記(b)で表される式+上記①で表される式で表される場合とは、 X^1 が式 $A^2 - A^3 - A^4 - A^5 - A^6 - A^7 - A^8 - A^9 - A^{10} - A^{11} - A^{12} - A^{13} - A^{14} - A^{15} - A^{16} - A^{17} - B^1 - B^2 - B^3 - B^4 - B^5 - B^6 - B^7 - B^8$ (式中、 A^2
 20 ないし A^{17} および B^1 ないし B^8 は上記と同意義を示す) で表される場合のことを
 いうが、この場合の好ましい具体例としては、

A^2 および A^3 がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい
 L-中性アミノ酸残基、好ましくは A^2 としては L-ロイシンなど、 A^3 として
 は L-バリンなどであり、

- 25 A^4 が側鎖が置換されていてもよい L-中性または L-塩基性アミノ酸残基、
 好ましくは L-グルタミン、L-リジンまたは N^ε-アセチルリジンなどであり

A⁵が側鎖が置換されていてもよいL-プロリン、好ましくは、L-プロリンなどであり、

- A⁶およびA⁹がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい
- 5 L-塩基性アミノ酸残基、好ましくはL-アルギニンなどであり、

A⁷が置換されていてもよいグリシン、好ましくはグリシンなどであり、

A⁸がL-プロリンまたはヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基、好ましくは、L-セリン、L-プロリンまたはオキシプロリン（ヒドロキシプロリン）などであり、

- 10 A¹⁰が、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、好ましくはL-セリン、L-スレオニン、L-アスパラギンなどであり、

A¹¹がグリシン、A¹²がL-プロリン、A¹³がグリシン、A¹⁴がL-アラニンまたはL-プロリンなどであり、

- 15 A¹⁵が芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、好ましくはL-トリプトファンなどであり、

A¹⁶がカルバモイル基を持つ中性L-アミノ酸残基、好ましくはL-グルタミンであり、

A¹⁷が中性アミノ酸残基、好ましくは、グリシンなどであり、

- 20 B¹が側鎖が置換されていてもよい中性L-アミノ酸残基、好ましくは、置換されていてもよいグリシン、より好ましくは、グリシンなどであり、

B²ないしB⁴がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性L-アミノ酸残基、好ましくは、B²としてはL-アルギニン、B³としてはL-アルギニン、B⁴としては、L-リジンなどであり、

- 25 B⁵が芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、好ましくは、L-フェニルアラニンなどであり、

B⁶およびB⁷がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性L-アミノ酸残基、好ましくは、L-アルギニンなどであり、

B⁸が側鎖が置換されていてもよいグルタミン、好ましくは、L-グルタミンなどである場合などがあげられる。

- 5 上記(a)で表される式+上記①で表される式で表される場合とは、X¹が式 A¹-A²-A³-A⁴-A⁵-A⁶-A⁷-A⁸-A⁹-A¹⁰-A¹¹-A¹²-A¹³-A¹⁴-A¹⁵-A¹⁶-A¹⁷-B¹-B²-B³-B⁴-B⁵-B⁶-B⁷-B⁸ (式中、A¹ないしA¹⁷およびB¹ないしB⁸は上記と同意義を示す) で表される場合のことをいうが、この場合の好ましい具体例としては、

- 10 A¹が芳香性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、より好ましくはL-チロシンなどであり、

A²およびA³がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいL-中性アミノ酸残基、好ましくはA²としてはL-ロイシンなど、A³としてはL-バリンなどであり、

- 15 A⁴が側鎖が置換されていてもよいL-中性またはL-塩基性アミノ酸残基、好ましくはL-グルタミン、L-αアミノアジピン酸、L-リジンまたはN^ε-アセチルリジンなどであり、

A⁵が置換されていてもよいL-プロリン、好ましくは、L-プロリンなどであり、

- 20 A⁶およびA⁹がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいL-塩基性アミノ酸残基、好ましくはL-アルギニンなどであり、

A⁷が置換されていてもよいグリシン、好ましくはグリシンなどであり、

A⁸がL-プロリンまたはヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基、好ましくは、L-セリン、L-プロリンまたはオキシプロリン (ヒドロキシプロリン

- 25) などであり、

A¹⁰がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または側鎖が置換されてい

てもよい中性アミノ酸残基、好ましくはL-セリン、L-スレオニン、L-アスパラギンなどであり、

A¹¹がグリシン、A¹²がL-プロリン、A¹³がグリシン、A¹⁴がL-アラニンまたはL-プロリンなどであり、

- 5 A¹⁵が芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、好ましくはL-トリプトファンなどであり、

A¹⁶がカルバモイル基を持つ中性L-アミノ酸残基、好ましくはL-グルタミンであり、

A¹⁷が中性アミノ酸残基、好ましくは、グリシンなどである、

- 10 B¹が側鎖が置換されていてもよい中性L-アミノ酸残基、好ましくは、置換されていてもよいグリシン、より好ましくは、グリシンなどであり、

B²ないしB⁴がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性L-アミノ酸残基、好ましくは、B²としてはL-アルギニン、B³としてはL-アルギニン、B⁴としては、L-リジンなどであり、

- 15 B⁵が芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、好ましくは、L-フェニルアラニンなどであり、

B⁶およびB⁷がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性L-アミノ酸残基、好ましくは、L-アルギニンなどであり、

- 20 B⁸が側鎖が置換されていてもよいグルタミン、好ましくは、L-グルタミンなどである場合などがあげられる。

X¹として、より具体的な好ましい例として、

(1) 水素原子、

(2) Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln、

- 25 (3) pGlu、

(4) Leu-Val-Adi(NH₂)-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-

Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln ,

(5) Leu-Val-Lys(Ac)-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln ,

(6) Tyr-Leu-Val-Lys-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly-

5 Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln , および

(7) Z-pGlu などがあげられる。

本明細書において、 X^2 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基を示すが、好ましくは側鎖が置換されていてもよいL-ロイシン、側鎖が置換されていてもよいL-ノルロイシン、より好ましくは、L-ロイシンまたはL-ノルロイシンなどがあげられる。

本明細書において、 X^3 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基を示す。塩基性アミノ酸残基の側鎖への置換基としては、例えば C_{1-4} アシル基、トシル基、 C_{1-6} アルキル基などがあげられる。

15 C_{1-4} アシル基としては、例えばホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリルなどのホルミルおよび C_{2-4} アルカノイルなどがあげられる。

C_{1-6} アルキル基としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどがあげられる。

20 X^3 として好ましくは、側鎖が置換されていてもよいL-リジン、側鎖が置換されていてもよいL-ノルロイシン、または側鎖が置換されていてもよいL-アルギニンなどがあげられ、より好ましくは、側鎖が C_{1-4} アシル基（例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリルなどのホルミルおよび C_{2-4} アルカノイルなど）、 C_{1-6} アルキル基（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなど）
25 またはトシル基で置換されていてもよいL-リジン、L-ノルロイシンまた

はL-アルギニンなどがあげられ、さらに好ましくは、L-リジン、L-ノルロイシン、L-アルギニン、N^ε-アセチルリジン、N^ε-メチルリジン、N^ε-トシルリジン、N^ε-トシルアルギニンなどがあげられる。

本明細書において、X⁴は結合手または側鎖が置換されていてもよい中性または芳香性アミノ酸残基を示す。X⁴として好ましくは、結合手、側鎖が置換されていてもよいL-ノルロイシン、側鎖が置換されていてもよいL-メチオニン、側鎖が置換されていてもよいL-メチオニンスルフォキシドまたは側鎖が置換されていてもよいL-アラニンなどがあげられ、より好ましくは結合手、L-ノルロイシンまたはL-メチオニン、L-メチオニンスルフォキシド、L-シクロヘキシルアラニンなどがあげられる。

本明細書において、X⁵は①側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、②水酸基または③側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基と側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基が結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体を示す。

X⁵として好ましくは、①側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、②水酸基または③側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基と側鎖が置換されていてもよい芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基が結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体などがあげられる。

X⁵としてさらに好ましくは、①側鎖が置換されていてもよいL-プロリンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、②側鎖が置換されていてもよい4-クロロフェニルアラニンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル

- 基に還元されたアミノ酸誘導体、③側鎖が置換されていてもよい2-ナフチルアラニンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、④側鎖が置換されていてもよいシクロヘキシルアラニンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、⑤水酸基または⑥置換されていてもよいL-プロリンと(a)側鎖が置換されていてもよいL-フェニルアラニン、(b)側鎖が置換されていてもよいL-チロシン、(c)側鎖が置換されていてもよいL-2-チエニルアラニン、(d)側鎖が置換されていてもよいL-フェニルグリシンもしくは(e)側鎖が置換されていてもよいL-2-ピリジルアラニンが結合してなるジペプチド鎖、またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体などがあげられる。
- X⁵としてさらに好ましくは、①L-プロリンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、②4-クロロフェニルアラニンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、③2-ナフチルアラニンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、④シクロヘキシルアラニンまたはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、⑤水酸基、⑥L-プロリンとL-フェニルアラニンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、⑦L-プロリンとL-チロシンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、⑧L-プロリンとL-2-チエニルアラニンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、⑨L-プロリンとL-フェニルグリシンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カル

ルボキシル基がヒドロキシルメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、⑩L-プロリンと4-クロロフェニルアラニンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシルメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、⑪L-プロリンと2-ナフチルアラニンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシルメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、⑫L-プロリンと3-ヨードチロシンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシルメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、⑬L-プロリンとO-メチルチロシンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシルメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体、または⑭L-プロリンとL-2-ピリジルアラニンが結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシルメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体などがあげられる。

「 $-X^4-X^5$ 」として、特に好ましくは、

- 15 (1) -Nle-Pro-Phe、
- (2) -Nle-Pro-Tyr、
- (3) -Nle-Pro、
- (4) -Nle、
- (5) -Met-Pro-Phe、
- 20 (6) -Nle-Pro-Thi、
- (7) -Nle-Pro-Phg、
- (8) -Nle-Pro-Pya(2)、
- (9) -Met(O)、
- (10) -Met-Phe(Cl)、
- 25 (11) -Met-Pro-Phe(Cl)、
- (12) -Met-Pro-Nal(2)、

(13) -Met-Nal(2)、

(14) -Met-Cha、

(15) -Cha-Pro-Phe、

(16) -Cha、

5 (17) -Met-Pro-Tyr(I)、および

(18) -Met-Pro-Tyr(Me)などがあげられる。

本発明のペプチドの具体例としては、例えば、

(1) Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-
Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-

10 Nle-Pro-Phe、

(2) Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-
Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-
Nle-Pro-Tyr、

(3) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、

15 (4) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr、

(5) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro、

(6) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle、

(7) Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr、

(8) Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro、

20 (9) Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle、

(10) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Met-Pro-Phe、

(11) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Met-Pro-Phe、

(12) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、

(13) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、

25 (14) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、

(15) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Arg(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、

- (16) pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe,
(17) pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr,
(18) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Thi,
(19) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phg,
5 (20) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Pya(2),
(21) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr,
(22) Leu-Val-Adi(NH₂)-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-
Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-
Pro-Nle-Pro-Phe,
10 (23) Leu-Val-Lys(Ac)-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-
Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-
Pro-Nle-Pro-Tyr,
(24) Tyr-Leu-Val-Lys-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-
Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-
15 Pro-Nle-Pro-Phe,
(25) Z-pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe,
(26) Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met(O),
(27) Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr,
(28) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Phe(Cl),
20 (29) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe(Cl),
(30) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Nal(2),
(31) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Nal(2),
(32) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe(Cl),
(33) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Phe(Cl),
25 (34) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Cha,
(35) p Glu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Cha-Pro-Phe,

(36) Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Cha、

(37) Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe(Cl)、

(38) Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Nle-Gly-Pro-Met-Pro-Phe(Cl)、

(39) Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Nle-Gly-Pro-Met-Pro-Tyr(I)、およ

5 び

(40) Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Nle-Gly-Pro-Met-Pro-Tyr(Me)などがあげられる。

本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

15 本発明のペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞からペプチドを精製する方法によって天然型のリガンドを取得した後、後述のペプチド合成法に準じて適宜修飾を加えて製造することができるし、また、天然型のリガンドを原料とせずに、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

20 なお、天然型のリガンドをヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

天然型のリガンドの取得方法は、例えば、WO 99/33976号（特願平
25 10-220853号）に記載の方法に準じて取得することができる。

本発明のペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って製造することが

できる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

① M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

② Schroeder および Luebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第 14 巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

保護されたアミノ酸またはペプチドの縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、トリスフォスフォニウム類、テトラメチルウロニウム類、カルボジイミド類等がよい。トリスフォスフォニウム類としてはベンゾトリアゾルー 1-イルオキシトリスピロリジノフォスフォニウムヘキサフルオロフォスフェイト(PyBOP)、プロモトリスピロリジノフォスフォニウムヘキサフルオロフォスフェイト(PyBroP)、テトラメチルウロニウム類としては 2-(1H-ベンゾトリアゾル-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウ

- ロニウムテトラフルオロボレイト、2-(5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレイト、O-(N-スクシミジル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレイト、カルボジイミド類としては DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチル
- 5 アミノプロピル) カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる縮合にはラセミ化抑制剤（例えば、HONB, HOBt, HOObt など）の添加が好ましい。縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえば無水または含水のN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸
- 10 アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用い
- 15 られる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。固相合成の場合にはニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を
- 20 行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシ

25 ベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニ

ル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、アリル、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C₂₋₄)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基などの有機酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基、トリチル基(Trt)などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、2,6-ジクルルベンジル、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾリルの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル(Mtr)、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

アルギニンのグアニジノ基の保護基としてはTos、Z、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルフォニル(Mtr)、p-メトキシベンゼンスルフォニル(MBS)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルフォニル(Pmc)、メシチレン-2-スルフォニル(Mts)、2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)、Boc、Z、NO₂などが挙げられる。

リジンの側鎖アミノ基の保護基としてはZ、Cl-Z、トリフルオロアセチル、Boc、Fmoc、Trt、Mtr、4,4-ジメチル-2,6-ジオキソサイクロヘキシリデンエイル(Dde)などが挙げられる。

トリプトファンのインドリル保護基としてはフォルミル(For)、Z、Boc、Mts、Mtrなどが挙げられる。

5 アスパラギン、グルタミンの保護基としては Trt、キサンチル(Xan)、4,4'-ジメトキシベンゾヒドリル(Mbh)、2,4,6-トリメトキシベンジル(Tmob)などが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、(HOBt) とのエステル] などが挙げられる。原料
10 のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応する亜リン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえばPd 黒あるいはPd 炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタン
15 スルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、臭化トリメチルシラン (TMSBr)、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート、テトラフルオロホウ酸、トリス(トリフルオロ)ホウ素、三臭化ホウ素あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中
20 ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃~40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾールのようなカチオン捕捉剤や、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオール等の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる
25 2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチ

オール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドのアミド体を得る方法としては、アミド体合成用樹脂を用いて固相合成するか又はカルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のペプチドは、さらに、機能あるいは性質がよく知られているタンパク質との融合タンパク質であってもよい。

本発明のペプチドは、①本発明のペプチドの有する生理作用の探索、②組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、③中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤あるいは生殖器機能調節剤などの医薬の開発などに用いることができる。

特に、後述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

さらに、上記③に関し、本発明のペプチドは中枢神経系、循環器系、心臓、免疫系、消化器系、代謝系または生殖器系などで発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識するものであるもので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のペプチドは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは生殖器機能調節作用などに関与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クロイツフェルトーヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、糖尿病（例、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症など）、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、前立腺癌など）、膵炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、

てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤などとしても用いることができる。

加えて、H I V感染症、エイズ（A I D S（Acquired Immune Deficiency Syndrome）：後天性免疫不全症候群）などの治療・予防剤として用いることができる。

本発明のペプチドを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬

を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM））、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マン

トヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のペプチドの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の肺気腫患者（体重60kgとして）への投与においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

上記本発明のペプチドに対するG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、ヒトや温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット

、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）のあらゆる組織（例えば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、例えば、配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。すなわち、G蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本明細書における配列番号：26で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、本明細書における配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と約90～99
5 9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、本明細書における配列番号：26で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。

これらの蛋白質が示す活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達活性などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、
15 レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

さらに、G蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、GlnのN端側が生体内で切断され、該Glnが
20 ピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸残基の側鎖が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものが挙げられる。
25

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩またはその部分ペプチドは、

ヒトや温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、また、前述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。すなわちG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものが用いられる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本明細書における配列番号：26のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接自体公知のRT-PCR法によって増幅することもできる。

具体的には、本明細書における配列番号：26で表されるのアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本明細書における配列番号：27で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

本発明のペプチドまたはその塩（以下、本発明のペプチド等と略記する場合

がある)などの用途について、以下に具体的に説明する。

(1) リガンドペプチド欠乏症の予防・治療剤

G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) に対する本発明のペプチド等が有する作用に応じて、本発明のペプチド等をリガンドペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) 欠乏症の予防・治療剤としても使用することができ
5 る。

例えば、生体内において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) が減少しているためにリガンドの生理作用 (中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは生殖器機能調節作用など) が期待できない患者がいる場合に、本発明のペプチド等を該患者に投与することによって、該患者の生体内のリガンドペプチドの量を増加させ、リガンドペプチドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明のペプチド等は、安全で低毒性なりガンドペプチド欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。
10

(2) リガンドペプチドに対するG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) の定量法
15

本発明のペプチド等はG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) またはその塩や該レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に対して結合性を有している
20 のので、生体内におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) もしくはその塩、または該レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の濃度を感度良く定量することができる。

該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) 分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。すなわちG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (A P J) の疎水性プロット解析において細胞外領域 (親水性 (Hydrophilic) 部位) であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性 (

25

Hydrophobic) 部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

- 5 G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) の部分ペプチドのアミド、エステルは上記した本発明のペプチドのアミドまたはエステルと同様にして得ることができる。また、G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) の部分ペプチドの塩としては、上記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。

- 10 すなわち、被検体を本発明のペプチド等と接触させることによって被検体中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) もしくはその塩、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) の部分ペプチドもしくはそのアミド、エステルまたはその塩の濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

(3) G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) と、本発明のペプチド等との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法

- 20 G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) またはその塩や該部分ペプチドもしくはそのアミド、エステルまたはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質 (APJ) の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) との結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、
25 蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など) またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レ

セプター（APJ）を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（即ちG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ちG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）などが含まれる。「結合性を変化させる」とは、本発明のペプチド等との結合を阻害する場合と本発明のペプチド等との結合を促進する場合の両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、（i）G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩または該レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のペプチド等を接触させた場合と（ii）上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩または該レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミド、エステルまたはその塩に、本発明のペプチド等および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のペプチド等と上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに、本発明のペプチド等を接触させた場合と（ii）上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに、本発明のペプチド等および試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに対する本発明のペプチド等の結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識した本発明のペプチド等を、上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質

- (APJ) もしくはその塩またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) の部分ペプチドもしくはそのアミド、エステルまたはその塩に接触させた場合と、標識した本発明のペプチド等および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) もしくはその塩またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) の部分ペプチドもしくはそのアミド、エステルまたはその塩に接触させた場合における、標識した本発明のペプチド等の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはそのアミド、エステルまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ②標識した本発明のペプチド等を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のペプチド等および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のペプチド等の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ③標識した本発明のペプチド等を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) に接触させた場合と、標識した本発明のペプチド等および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) に接触させた場合における、標識した本発明のペプチド等の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) との結合性を変化させる化

合物またはその塩のスクリーニング方法、

- ④G蛋白質共役型レセプター（APJ）を活性化する化合物（例えば、本発明ペプチド）をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を含有する細胞に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプター（APJ）を活性化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター（APJ）を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ⑤G蛋白質共役型レセプター（APJ）を活性化する化合物（例えば、本発明のペプチド等）をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプター（APJ）を活性化する化合物、および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター（APJ）を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法など

である。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）としては、上記のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）などが適している。

10 本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

15 G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

20 エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）, 60巻, 160(1968)〕, JM103〔ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（*Journal of Molecular Biology*）, 120巻, 517(1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラ

ー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・
5 オブ・バイオケミストリー (*Journal of Biochemistry*), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2, AH 2 2 R⁻, NA 8 7-1 1 A, DKD-5 D, 2 0 B-1 2 などが用いられる。

10 昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM 細胞、
15 *Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 [以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

20 動物細胞としては、たとえばサル COS-7 細胞, V ero 細胞, チャイニーズハムスター細胞 CHO, DHFR 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (d h f r-CHO 細胞), マウス L 細胞, マウス 3 T 3 細胞, マウスミエローマ細胞, ヒト HEK 2 9 3 細胞, ヒト FL 細胞, 2 9 3 細胞, C 1 2 7 細胞, BALB 3 T 3 細胞, S p-2/O 細胞などが用いられる。

25 膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem

型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 10 該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できる
- 15 ようになる。

本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプターとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した本発明のペプチド等が用いられる。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か

20 、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば [^3H]、[^{125}I]、[^{14}C]、[^{35}S]などで標識されたりガンドなどを利用することができる。

- 25 具体的には、本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レ

- セプター蛋白質 (APJ) を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4~10 (望ましくはpH 6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、
- 5 CHAPS、Tween-80TM (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターや本発明のペプチド等の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどの
- 10 プロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml~10 ml の該レセプター溶液に、一定量 (5000 cpm~500000 cpm) の標識した本発明のペプチド等を添加し、同時に $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の本発明のペプチド等を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。
- 15 反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B0) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B0-NSB) を100%とした時、
- 20 特異的結合量 (B-NSB) が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- 本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離
- 25 、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン

酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分、および本発明のペプチド等を含有するものであ

る。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

- 5 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター (APJ) 標品

- 10 G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識した本発明のペプチド等

- 15 [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した本発明のペプチド等を適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④本発明のペプチド等標準液

本発明のペプチド等を0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

20 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

- 25 ② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識した本発明のペプチド等を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μ l加えておく

。

③反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した本発明のペプチド等を0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 ml の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

- 5 ④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

- 10 B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター

- 15 (APJ) との結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物
- 20 、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記G蛋白質共役型レセプターアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(i)または(ii)に従えばよい。

- (i) 前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイ
- 25 を行い、本発明のペプチド等とG蛋白質共役型レセプター(APJ)との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記し

たG蛋白質共役型レセプター（APJ）を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストである。

- 5 (ii) (a)試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を含有する細胞に接触させ、上記G蛋白質共役型レセプター（APJ）を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアゴニストである。

- (b)G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物（例えば、本発明のペプチド等またはG蛋白質共役型レセプターアゴニストなど）をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を含有する細胞に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプター（APJ）を活性化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター（APJ）を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。G
10 蛋白質共役型レセプター（APJ）を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストである。

- 該G蛋白質共役型レセプターアゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）に対する本発明のペプチド等が有する生理活性と同様の作用を有
20 しているので、本発明のペプチド等と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

- 逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）に対する本発明のペプチド等が有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として
25 有用である。

本発明のペプチド等は中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能

- 調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは生殖器機能調節作用などに関与していることから、上記したアゴニストあるいはアンタゴニストをたとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クロイツフェルトーヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、低血糖症、下垂体機能低下症、下垂体性小人症、糖尿病（例：糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症など）、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、前立腺癌など）、肺炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに催眠鎮静剤、手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤、降圧剤などとしても用いることができる。

加えて、HIV感染症、エイズ（AIDS（Acquired Immune Deficiency Syndrome）：後天性免疫不全症候群）などの治療・予防剤として用いることができる。

- 25 上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例え

ば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩

5 、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩があげられる。

10 無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

15 塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のペプ

20 チド等を医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。

またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を

25 示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
5	C	: シトシン
	Y	: チミンまたはシトシン
	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン
10	W	: チミンまたはアデニン
	S	: シトシンまたはグアニン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
15	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
20	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	GlyまたはG	: グリシン
	AlaまたはA	: アラニン
	ValまたはV	: バリン
25	LeuまたはL	: ロイシン
	IleまたはI	: イソロイシン

	S e r または S	: セリン
	T h r または T	: スレオニン
	C y s または C	: システイン
	M e t または M	: メチオニン
5	G l u または E	: グルタミン酸
	A s p または D	: アスパラギン酸
	L y s または K	: リジン
	A r g または R	: アルギニン
	H i s または H	: ヒスチジン
10	P h e または F	: フェニルアラニン
	T y r または Y	: チロシン
	T r p または W	: トリプトファン
	P r o または P	: プロリン
	A s n または N	: アスパラギン
15	G l n または Q	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
20	P h	: フェニル基
	N l e	: ノルロイシン
	T h i	: 2-チエニルアラニン
	P h g	: フェニルグリシン
	P y a (2)	: 2-ピリジルアラニン
25	A d i (NH ₂)	: 2-アミノアジピン酸-6アミド
	H y p	: オキシプロリン (ヒドロキシプロリン)

	Ac-Arg	: N ^α -アセチルアルギニン
	Lys (Ac)	: N ^ε -アセチルリジン
	Lys (Me)	: N ^ε -メチルリジン
	Lys (Tos)	: N ^ε -トシルリジン
5	Arg (Tos)	: N ^ε -トシルアルギニン
	Phe (Cl)	: 4-クロロフェニルアラニン
	Nal (2)	: 2-ナフチルアラニン
	Cha	: シクロヘキシルアラニン
	Met (O)	: メチオニンスルフォキシド
10	Tyr (Me)	: O-メチルチロシン
	Tyr (I)	: 3-ヨードチロシン

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	Tos	: p-トルエンスルフォニル
15	HONB	: N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	Bzl	: ベンジル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
20	Cl-Z	: 2-クロルベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
	HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	TFA	: トリフルオロ酢酸
25	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル

- Bum : ターシャリープトキシメチル
Trt : トリチル
Pbf : 2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スル
ホニル
- 5 HOObt : 3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-
1,2,3-ベンゾトリアジン
TFE : トリフルオロエタノール
HOAt : 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
PyBrop : プロモトリスピロリジノホスホニウム ヘキサフル
- 10 オロホスフェイト
TMS-Br : 臭化トリメチルシリル
TC : チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基
Bom : ベンジルオキシメチル
NMP : N-メチルピロリドン
- 15 PAM : フェニルアセトアミドメチル
DCM : ジクロロメタン
DMF : N,N-ジメチルホルムアミド
DIEA : N,N-ジイソプロピルエチルアミン
Clt : 2-クロロトリチル
- 20 For : ホルミル

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕 後述の実施例1で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕 後述の実施例2で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕 後述の実施例3で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：4〕 後述の実施例4で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕 後述の実施例5で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕後述の実施例6で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕後述の実施例7で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕後述の実施例8で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕後述の実施例9で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：10〕後述の実施例10で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕後述の実施例11で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：12〕後述の実施例12で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕後述の実施例13で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕後述の実施例14で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：15〕後述の実施例15で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕後述の実施例16で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：17〕後述の実施例17で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕後述の実施例18で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：19〕後述の実施例19で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：20〕後述の実施例20で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕後述の実施例21で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕後述の実施例22で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：23〕後述の実施例23で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕後述の実施例24で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：25〕後述の実施例25で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：26〕APJのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：27〕配列番号：26のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：28〕後述の実施例26で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：29〕後述の実施例27で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：30〕後述の実施例28で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：31〕後述の実施例29で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：32〕後述の実施例30で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：33〕後述の実施例31で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：34〕後述の実施例32で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

す。

〔配列番号：35〕後述の実施例33で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：36〕後述の実施例34で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：37〕後述の実施例35で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：38〕後述の実施例36で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：39〕後述の実施例37で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：40〕後述の実施例38で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：41〕後述の実施例39で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：42〕後述の実施例40で得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

実施例

20 以下に実施例および実験例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1 Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-

25 Pro-Nle-Pro-Phe の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Phe-OH を導入し

た Fmoc-Phe-O-Clt resin (0.32mmol/g) 0.25mmol 分をペプチド合成機 ABI 433A の反応曹に入れ、Fmoc/DCC/HOBt 法を用い、固相合成を行った。Fmoc アミノ酸の側鎖保護基は Arg には Pbf 基、Ser に tBu 基、Trp、Lys に Boc 基、His、Asn、Gln に Trt 基を用いた。他のアミノ酸は側鎖無保護のものを用い、
5、上記に示す配列の Phe から N 末端方向へ順に Leu までペプチド鎖を導入し、目的の保護ペプチド樹脂を得た。

この樹脂 50mg(4.45mmol)を TFA, thioanisole, m-cresol, H₂O, ethanedithiol (82.5:5:5:5:2.5)の混合液 1ml 中で室温、2 時間攪拌した後、反応溶液にエーテルを加え、白色粉末を析出させ遠心分離後、上清を除く操作を 3 回繰り返した、
10。残渣を水で抽出後、凍結乾燥し白色粉末を 23.1mg 得た。得られた粗ペプチドを TSK GEL ODS 120T カラム(20 x 300mm)を用いた分取 HPLC で、A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルによる A/B: 85/15~75/25 への直線型濃度勾配溶出(60 分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末 10.2mg を得た。

15 質量分析による(M+H)⁺ 4176.0 (計算値 4176.3)

HPLC 溶出時間 17.8 分

溶出条件

カラム YMC A-301-3 (4.6 x 100mm)

溶離液 A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、A/B:
20 100/0~50/50 へ直線型濃度勾配溶出(25 分)

流速 1.0ml/分

実施例 2 Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-
25 Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

実施例 1 の 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) に導入するアミノ酸を

Fmoc-Tyr(tBu)-OH に変更し同様に合成、精製を行い、目的物を凍結乾燥白色粉末 13.3mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 4192.0 (計算値 4192.3)

HPLC 溶出時間 16.9 分

5 溶出条件

カラム YMC A-301-3 (4.6 x 100mm)

溶離液 A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~50/50 へ直線型濃度勾配溶出(25 分)

流速 1.0ml/分

10

実施例 3 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Gly-OH を導入した Fmoc-Gly-O-Clt resin(0.392mmol/g) 0.25mmol 分をペプチド合成機 ABI 433A の反応曹に入れ、Fmoc/ DCC/ HOBt 法を用い、Fmoc-Lys(Boc),
15 Fmoc-His(Trt), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Pro, Fmoc-Arg(Pbf), Boc-Gln の順に導入し、目的の保護ペプチド樹脂を得た。

この樹脂 1 g を、AcOH: TFE: DCM (1:2:7) 20ml 中で室温、2 時間攪拌した後、濾過によって樹脂を除き、溶媒を留去しエーテルで結晶化し、保護ペプチド
(Boc-Gln-Arg(Pbf)-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ser(tBu)-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OH)

20 362mg を得た。

H-Phe-OBzl·HCl に Boc-Pro, Boc-Nle, Boc-Pro を順に縮合し Boc-Pro-Nle-Pro-Phe-Bzl を 180mg 得た。

Boc-Gln-Arg(Pbf)-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ser(tBu)-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OH
50mg と HOAt 3.96mg を DCM:DMF(4:1) 700ml に溶かし、氷冷下に DIEA
25 19.7ml, PyBrop 13.5mg, H-Pro-Nle-Pro-Phe-OBzl·HCl (Boc-Pro-Nle-Pro-Phe-Bzl を 4N-HCl/ジオキサンで処理し調製) 18.2mg を加えた後、氷浴を取り

、室温で 1hr 攪拌した。クエン酸結晶を溶液に加え中和した後、溶媒を留去、水を加え析出した固体をクロロホルムで抽出した。1N 塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を留去しエーテルを加え粉末を濾取、さらに酢酸エチルとエーテルから再沈殿精製し Boc-Gln-
5 Arg(Pbf)-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ser(tBu)-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OBzl 56mg を得た。

これを thioanisole 982 μ l, m-cresol 110 μ l, triisopropylsilane 215 μ l, TFA 4ml 中で室温 90 分攪拌した後 TMS-Br 1.1ml を加え、氷冷下 1 時間攪拌後、氷浴を外し 20℃の水浴上でさらに 1hr 攪拌した。反応後、反応溶液を留去
10 し、残渣にエーテルを加え、白色粉末を析出させ遠心分離後、上清を除く操作を 3 回繰り返した。残渣を水で抽出後、凍結乾燥し白色粉末を得た。続いて、得られた粉末を 80%AcOH に溶解、70℃で 2hr 加温後、溶液を水で希釈し凍結乾燥した。得られた粗ペプチドを TSK GEL ODS 120T カラム(20 x 300mm)を用いた分取 HPLC で、A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルによる A/B: 80/29~70/30 への直線型濃度勾配溶出(60 分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末 14mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1515.7 (計算値 1515.9)

HPLC 溶出時間 16.8 分

溶出条件

20 カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、
A/B: 95/5~45/55 へ直線型濃度勾配溶出(25 分)

流速 1.0ml/分

25 実施例 4 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

実施例 3 の H-Phe-OBzl·HCl を H-Tyr(Bzl)·OBzl.HCl に代え同様の方法で

合成、精製を行い白色粉末 29mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1532.0 (計算値 1531.9)

HPLC 溶出時間 14.6 分

溶出条件

5 カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、
A/B: 95/5～45/55 へ直線型濃度勾配溶出(25 分)

流速 1.0ml/分

10 実施例 5 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro の製造

実施例 3 の H-Phe-OBzl·HCl を H-Pro-OBzl·HCl に代え合成した Boc-Pro-Nle-Pro-OBzl を用い同様に合成、精製し白色粉末 8mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1368.4 (計算値 1368.8)

HPLC 溶出時間 13.8 分

15 溶出条件

カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、
A/B: 95/5～45/55 へ直線型濃度勾配溶出(25 分)

流速 1.0ml/分

20

実施例 6 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle

実施例 3 の H-Phe-OBzl·HCl を H-Nle-OBzl·HCl に代え合成した Boc-Pro-Nle-OBzl を用い同様に合成、精製し白色粉末 9mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1272.0 (計算値 1271.7)

25 HPLC 溶出時間 12.9 分

溶出条件

カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、
A/B: 95/5～45/55 へ直線型濃度勾配溶出(25 分)

流速 1.0ml/分

5

実施例 7 Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

市販 Boc-Tyr(Br-Z)-OCH₂-PAM 樹脂 (0.69 m mole/g resin) 0.5 m mole 分を
ペプチド合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプ
チド合成方法で Boc-Pro, Boc-Nle, Boc-Pro, Boc-Gly, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-
10 His(Bom), Boc-Ser(Bzl), Boc-Leu, Boc-Arg(Tos), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos)を順に
導入し、最終の Boc 基を除去後無水酢酸でアセチル化し目的の保護ペプチド樹
脂を得た。この樹脂 0.25 g を p-クレゾール 0.46 g と共に無水弗化水素 5 ml
中、0℃ 60 分撹拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエー
テルを加え沈殿を濾取後、酢酸水に抽出した。抽出液を十分に濃縮後、蒸留水
15 とジエチルエーテルを加え分液抽出し、水層を集め凍結乾燥し、少量の 50 %
酢酸水に溶解後、同溶媒で充填したセファデックスTM G-25 カラム (2.0 x 80 cm)
に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め凍結乾燥し、白色粉末 53 mg を得た。
此れを LiChroprepTM RP-18 を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm) に
付け 0.1%TFA 水 200ml で洗浄、0.1%TFA 水 300ml と 0.1%TFA 含有 33%
20 アセトニトリル水 300ml を用いた線型勾配溶出を行い、アセトニトリル濃度
20%前後の画分を集め凍結乾燥し、白色粉末 30mg を得た。
質量分析による(M+H)⁺ 1462.4 (計算値 1462.8)

実施例 8 Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro の製造

25 市販 Boc-Pro-OCH₂-PAM 樹脂に配列アミノ酸を順に導入し実施例 7 と同様
に合成、精製を行い目的物の白色粉末 73 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1299.5 (計算値 1299.8)

実施例 9 Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle の製造

市販ペプチド合成用クロロメチル樹脂に Boc-Nle を導入した(0.57mmol/g)。

- 5 これを用い実施例 7 と同様に合成、精製を行い目的物の白色粉末 29 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1202.9 (計算値 1202.7)

10 実施例 10 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Met-Pro-Phe の製造

市販 Boc-Phe-OCH₂-PAM 樹脂 (0.72 m mole/g resin)を用い Boc-Lys(Cl-Z) を Boc-Lys(Ac)にまた Boc-Nle を Boc-Met に変更し、実施例 7 と同様に配列順にアミノ酸を導入した。最後のアセチル化に代え Z-pGlu を各 Boc-アミノ酸と同様の条件で導入した。この樹脂を実施例 7 と同様に弗化水素処理、精製し目的物の白色粉末 70 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1575.5 (計算値 1575.8)

実施例 11 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Met-Pro-Phe の製造

- 20 実施例 10 の Boc-Lys(Ac)を Boc-Lys(Me·Boc)に代え同様に合成、精製し目的物の白色粉末 35 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1547.5 (計算値 1547.8)

25 実施例 12 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

実施例 10 の Boc-Met を Boc-Nle に代え同様に合成、精製し目的物の白色粉

末 58 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1558.1 (計算値 1557.9)

5 実施例 1 3 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe
の製造

実施例 1 1 の Boc-Met を Boc-Nle に代え同様に合成、精製し目的物の白色粉末 58 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1529.6 (計算値 1529.9)

10 実施例 1 4 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe
の製造

実施例 1 2 の Boc-Lys(Ac)を Boc-Lys(Tos)に代え同様に合成、精製し目的物の白色粉末 60 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1670.2 (計算値 1669.9)

15

実施例 1 5 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Arg(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe
の製造

実施例 1 と同じ Fmoc-Phe-O-Clt resin を用い、目的配列アミノ酸を同様に導入した。Fmoc アミノ酸の側鎖保護基は最初に導入する Arg のみ Tos 基を用い他は Pbf 基を、Ser には tBu 基を、Trp、Lys には Boc 基を、His、Asn、Gln には Trt 基を用いた。他のアミノ酸は側鎖無保護のものを、又 pGlu は保護する事無く用い実施例 1 と同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 40 mg を得た。

20

質量分析による(M+H)⁺ 1697.7 (計算値 1697.9)

25

実施例 1 6 pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

実施例 15 と同じ方法でかつ Arg の側鎖保護基にはすべて PBf を用い同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 66 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1515.8 (計算値 1515.9)

5 実施例 17 pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

実施例 7 の Boc-Tyr(Br-Z)-OCH₂-PAM 樹脂 (0.69 m mole/g resin) を用い、実施例 10 の Boc-Lys(Ac) を Boc-Lys(Cl-Z) に Boc-Leu を Boc-Nle に代え同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 37 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1531.6 (計算値 1531.9)

10

実施例 18 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Thi の製造

実施例 3 の Phe を Thi に代え同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 21 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1521.7 (計算値 1521.8)

15

実施例 19 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phg の製造

実施例 3 の Phe を Phg に代え同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 16 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1501.4 (計算値 1501.8)

20

実施例 20 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Pya(2) の製造

実施例 3 の Phe を Pya(2) に代え同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 25 mg を得た。

25 質量分析による(M+H)⁺ 1516.7 (計算値 1516.9)

実施例 2 1 Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

実施例 7 のアセチル化を行う事無く樹脂を弗化水素を処理し、実施例 3 と同様に精製し目的物の白色粉末 85 m g を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1421.0 (計算値 1420.8)

5

実施例 2 2 Leu-Val-Adi(NH₂)-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

10 実施例 1 0 と同じ樹脂を用い、側鎖保護基として、Lys には Cl-Z 基を、His には Bom 基を、Ser には Bzl 基を、Arg には Tos 基を、Trp には For 基を用い配列順に Boc-アミノ酸を導入した。これを p-クレゾール、1,4-ブタンジチオール共存下、弗化水素処理し、実施例 3 と同様に精製し目的物の白色粉末 20 m g を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 4190.1 (計算値 4190.4)

15

実施例 2 3 Leu-Val-Lys(Ac)-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

20 実施例 7 と同じ樹脂を用い、側鎖保護基として最初の Lys のみ Ac 基、他は Cl-Z 基を、His には Bom 基を、Ser には Bzl 基を、Arg には Tos 基を、Trp には For 基を用い配列順に Boc-アミノ酸を導入し、実施例 2 2 と同様に脱保護、精製し目的物の白色粉末 24 m g を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 4234.2 (計算値 4234.4)

25 実施例 2 4 Tyr-Leu-Val-Lys-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-

Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

Fmoc アミノ酸の側鎖保護基は Arg には Pbf 基、Ser、Thr、Tyr に tBu 基、Trp、Lys に Boc 基、His、Asn、Gln に Trt 基を用い実施例 1 と同様に合成、精製し目的物の白色粉末 17 mg を得た。

5 質量分析による(M+H)⁺ 4344.6 (計算値 4344.5)

実施例 2 5 Z-pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

実施例 1 5 の Arg(Tos)を Lys(Ac)に、pGlu を Z-pGlu に代え、同様に合成、
10 精製し目的物の白色粉末 67 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1692.2 (計算値 1691.9)

実施例 2 6 Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met(O)の製造

15 市販 Boc-Met(O)-OCH₂-PAM 樹脂 (0.72 m mole/g resin) に側鎖保護基として Lys には Cl-Z 基を、His には Bom 基を、Ser には Bzl 基を、Arg には Tos 基を用いた Boc-アミノ酸を配列順に導入し、実施例 7 と同様に脱保護、精製し目的物の白色粉末 19 mg を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1634.9 (計算値 1634.9)

20

実施例 2 7 Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

実施例 2 の化合物製造時、Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の配列を導入したところで樹脂を取り出し、これを実施例

25 2 と同様に脱保護、精製し目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1860.9 (計算値 1861.1)

HPLC 溶出時間 16.75 分

溶出条件

カラム YMC ODS AM-301, S-5mm, 120A (4.6 x 100mm)

溶離液 A 液: 0.1%TFA-水、B 液: 0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、

5 A/B: 100/0~50/50 へ直線型濃度勾配溶出(25 分)

流速 1.0ml/分

実施例 28 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Phe(Cl)の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Cl_t resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Phe(Cl)-OH を導
10 入した Fmoc-Phe(Cl)-O-Cl_t resin (0.42mmol/g)を用い実施例 15 と同様に配列
順にアミノ酸を導入後、脱保護、精製を進め目的化合物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1471.0 (計算値 1470.7)

HPLC 溶出時間 19.39 分 (溶出条件: 実施例 27 と同じ)

15 実施例 29 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe(Cl)の
製造

実施例 28 と同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1567.7 (計算値 1567.8)

HPLC 溶出時間 19.81 分 (溶出条件: 実施例 27 と同じ)

20

実施例 30 Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Nal(2)の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Cl_t resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Nal(2)-OH を導入
した Fmoc-Nal(2)-O-Cl_t resin (0.45mmol/g)を用い実施例 15 と同様に配列順に
アミノ酸を導入後、脱保護、精製を進め目的化合物を得た。

25 質量分析による(M+H)⁺ 1472.6 (計算値 1472.8)

HPLC 溶出時間 20.48 分 (溶出条件: 実施例 27 と同じ)

実施例 3 1 Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Nal(2)の製造

実施例 3 0 と同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1375.5 (計算値 1375.7)

5 HPLC 溶出時間 20.35 分 (溶出条件: 実施例 2 7 と同じ)

実施例 3 2 Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe(Cl)の製造

Fmoc-Phe(Cl)-O-Clt resin (0.42mmol/g)を用い実施例 28 と同様に目的物を得た。

10 質量分析による(M+H)⁺ 1456.5 (計算値 1456.7)

HPLC 溶出時間 19.71 分 (溶出条件: 実施例 2 7 と同じ)

実施例 3 3 Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Phe(Cl)の製造

実施例 32 と同様に目的物を得た。

15 質量分析による(M+H)⁺ 1359.6 (計算値 1359.7)

HPLC 溶出時間 19.32 分 (溶出条件: 実施例 2 7 と同じ)

実施例 3 4 Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Cha の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Cha-OH を導入した Fmoc-Cha-O-Clt resin (0.49mmol/g)を用い実施例 31 と同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1331.7 (計算値 1331.8)

HPLC 溶出時間 19.46 分 (溶出条件: 実施例 2 7 と同じ)

25 実施例 3 5 p Glu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Cha-Pro-Phe の製造

Fmoc-Phe-O-Clt resin (0.32mmol/g)を用い実施例 28 と同様に目的物を得た

。

質量分析による(M+H)⁺ 1555.8 (計算値 1555.9)

HPLC 溶出時間 21.35 分 (溶出条件：実施例 27 と同じ)

5

実施例 36 Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Cha の製造
実施例 34 と同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1640.7 (計算値 1640.9)

10 実施例 37 Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-
Phe(Cl)の製造

Fmoc-Phe(Cl)-O-Clt resin (0.42mmol/g)を用い実施例 27 と同様に目的物を
得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1897.5 (計算値 1897.7)

15

実施例 38 Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Nle-Gly-Pro-Met-Pro-
Phe(Cl)の製造

実施例 37 と同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1882.3 (計算値 1882.6)

20

実施例 39 Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Nle-Gly-Pro-Met-Pro-
Tyr(I)の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Tyr(I)-OH を導入
した Fmoc-Tyr(I)-O-Clt resin (0.31mmol/g)を用い実施例 38 と同様に目的物を

25 得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1989.7 (計算値 1989.9)

実施例 40 Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Nle-Gly-Pro-Met-Pro-Tyr(Me)の製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Tyr(Me)-OH を導入した Fmoc-Tyr(Me)-O-Clt resin (0.39mmol/g)を用い実施例 38 と同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1878.1 (計算値 1878.3)

実験例 1

10 実施例 3, 4 のペプチドおよび実施例 1 の化合物の対応天然型ペプチド (即ち非天然アミノ酸 Nle が Met に置換されたペプチド) のそれぞれを滅菌蒸留水を用いて 1×10^{-3} M の濃度に溶解した後、0.1% BSA を含むサイトセンサー用培地を用いて段階的に希釈したものを調製した。WO 99/33976 号 (特願平 10-220853 号) と同様にして準備した A10 受容体 cDNA 導入 CHO 細胞をサイトセンサーのワークステーションにセットし、各細胞の Acidification Rate が安定したところでペプチド希釈液をサイトセンサーの流路の一つに導入し、流路の切り替えによって細胞に 1 分 2 秒間作用させた。細胞の反応が最大となった時点の Acidification Rate の変化量を Basal level の値を 100% として算出し、その結果を図 1 に示した。

20

実験例 2 ホルスコリン刺激 cAMP 産性の抑制活性の測定

24-well 組織培養プレートに WO 99/33976 号 (特願平 10-220853 号) の実施例 7 に記載の CHO-A10 clone 6 細胞を 3×10^5 cells/well で播種し、一晚培養した。0.2mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、0.05% ウシ血清アルブミンを含有する Hanks' balanced salt solution (HBSS) をアッセイバッファーとして準備し、各 well を 500 μ l のアッセイバッファーで 2 回洗

- 5 浄した後、37℃で30分間ブレインキュベーションを行なった。さらに500 μ l
 のアッセイバッファーで1回洗浄した後、1 μ Mのホルスコリンを添加したアッ
 セイバッファーに溶解したサンプルを500 μ lずつ各wellに添加し、37℃で30
 分間インキュベーションを行なった。細胞の基礎的cAMP産性量(basal level
 10)を知るためにホルスコリンを加えないアッセイバッファーでインキュベーシ
 ョンしたwellを、また、ホルスコリン刺激による最大cAMP産性量(
 maximum level)を知るためにホルスコリンを添加したアッセイバッファーで
 インキュベーションしたwellも同様に用意した。インキュベーション終了後に
 各wellを500 μ lのアッセイバッファーで1回洗浄した後、各wellに
 15 Amersham社のcAMP EIA systemに付属のlysis buffer 1Bを500 μ lを加え
 、cAMPの抽出を行なった。キットの処方に従い、各抽出液のうち100 μ l
 を用いてcAMP量の測定をおこなった。cAMPの産性抑制活性量は、
 maximum levelとサンプルを添加したwellのcAMP量の差(cAMPの産性
 抑制量)を求め、さらにホルスコリンに刺激によるcAMP産性増大量(
 15 maximum levelとbasal levelの差)に対する百分率として算出し、その用量反
 応曲線からEC₅₀値を求めた。

表1に、実験例2の方法で測定した実施例化合物の活性を示す。

表1

化 合 物	EC ₅₀ (n M)
実施例 2 の化合物	0.41
実施例 3 の化合物	0.28
実施例 4 の化合物	0.19
実施例 10 の化合物	0.25
実施例 29 の化合物	0.48
実施例 30 の化合物	0.28
実施例 31 の化合物	0.30
実施例 32 の化合物	0.20
実施例 33 の化合物	0.10

実施例 3 4 の化合物	0.37
実施例 3 5 の化合物	0.34
実施例 3 6 の化合物	0.16
実施例 3 7 の化合物	0.14
実施例 3 8 の化合物	0.35
実施例 1 の化合物の対 応天然型ペプチド（即 ち非天然アミノ酸 Nle が Met に置換されたペ プチド）	0.52

産業上の利用可能性

- 本発明のペプチドは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは
- 5 生殖器機能調節作用などに関与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クロイツフェルトーヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミン B 1 2 欠乏症
- 10 、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、低血糖症、下垂体機能低下症、下垂体性小人症、糖尿病（例：糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症など）、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、肺癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌など）、肺炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋

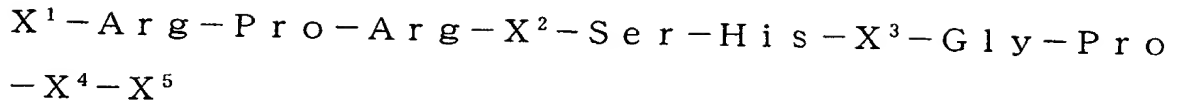
萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髓小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに催眠鎮静剤、手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤、降圧剤などとしても用いることができる。

5

加えて、H I V感染症、エイズ（A I D S（Acquired Immune Deficiency Syndrome）：後天性免疫不全症候群）などの治療・予防剤として用いることができる。

請求の範囲

1. 式



- 5 [式中、 X^1 は水素原子またはそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 X^2 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基を示し、 X^3 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、側鎖が置換されていてもよい芳香性アミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基を示し、 X^4 は結合手または側鎖が置換されていてもよい中性または芳香性アミノ酸残基を示し、 X^5 は①側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたアミノ酸誘導体、②水酸基または③側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基と側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基が結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボキシル基がヒドロキシメチル基またはホルミル基に還元されたペプチド誘導体を示し、式中的 $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ 、 $-\text{Ser}-\text{His}-$ または $-\text{Gly}-\text{Pro}-$ 中の各アミノ酸残基の側鎖は置換されていてもよい。但し、 X^2 がLeuを、 X^3 がLysを、 X^4 がMetを示し、かつ X^5 が①Proまたは②Pro-Pheを示し、式中的 $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ が無置換の $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ を、 $-\text{Ser}-\text{His}-$ が無置換の $-\text{Ser}-\text{His}-$ を、かつ $-\text{Gly}-\text{Pro}-$ が無置換の $-\text{Gly}-\text{Pro}-$ を示す場合を除く。]で表されるペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

2. X^1 が側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基である請求項1記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

3. X^1 が置換されていてもよいpGluまたは側鎖が置換されていてもよい

G1nである請求項1記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

4. X^1 が式 Y^1-Y^2 (式中、 Y^1 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし17個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 Y^2 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし8個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す) で表される請求項1記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

5. Y^2 が ① 式 $B^1-B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、 B^1 ないし B^8 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、② 式 $B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、③ 式 $B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、④ 式 $B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑤ 式 $B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑥ 式 $B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑦ 式 B^7-B^8 (式中、各記号は上記と同意義を示す) または⑧ 式 B^8 (式中、 B^8 は上記と同意義を示す) で表されるペプチド鎖である請求項4記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

6. B^1 が側鎖が置換されていてもよい中性 アミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

7. B^1 が置換されていてもよいGlyである請求項6記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

8. B^2 、 B^3 および B^4 がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

9. B^5 が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

10. B^6 および B^7 がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていても

よい塩基性アミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

11. B⁸が側鎖が置換されていてもよいGlnである請求項5記載のペプチド。

- 5 12. Y¹が(a) 式 $A^1-A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、A¹ないしA¹⁷はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、(b) 式 $A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(c) 式 $A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(d) 式 $A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(e) 式 $A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(f) 式 $A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(g) 式 $A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(h) 式 $A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(i) 式 $A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(j) 式 $A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(k) 式 $A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(l) 式 $A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(m) 式 $A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(n) 式 $A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(o) 式 A¹

$^5 - A^{16} - A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(p) 式 $A^{16} - A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す) または (q) A^{17} (A^{17} は前記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖である請求項4記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

5 13. A^1 が芳香性の側鎖を有するアミノ酸残基である請求項12記載のアミノ酸残基またはペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

14. A^2 および A^3 が側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

15. A^4 が側鎖が置換されていてもよい中性または塩基性-L-アミノ酸残
10 基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

16. A^5 が側鎖が置換されていてもよいProである請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

17. A^6 および A^9 がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエ
15 テルまたはそれらの塩。

18. A^7 および A^{10} がそれぞれ同一または異なって、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

19. A^8 がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である請求項12記載
20 のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

20. A^8 がSer、ProまたはHypである請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

21. A^{10} がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

25 22. A^{11} ないし A^{14} がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステル

またはそれらの塩。

23. A^{15} が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

24. A^{15} がTrpである請求項23記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

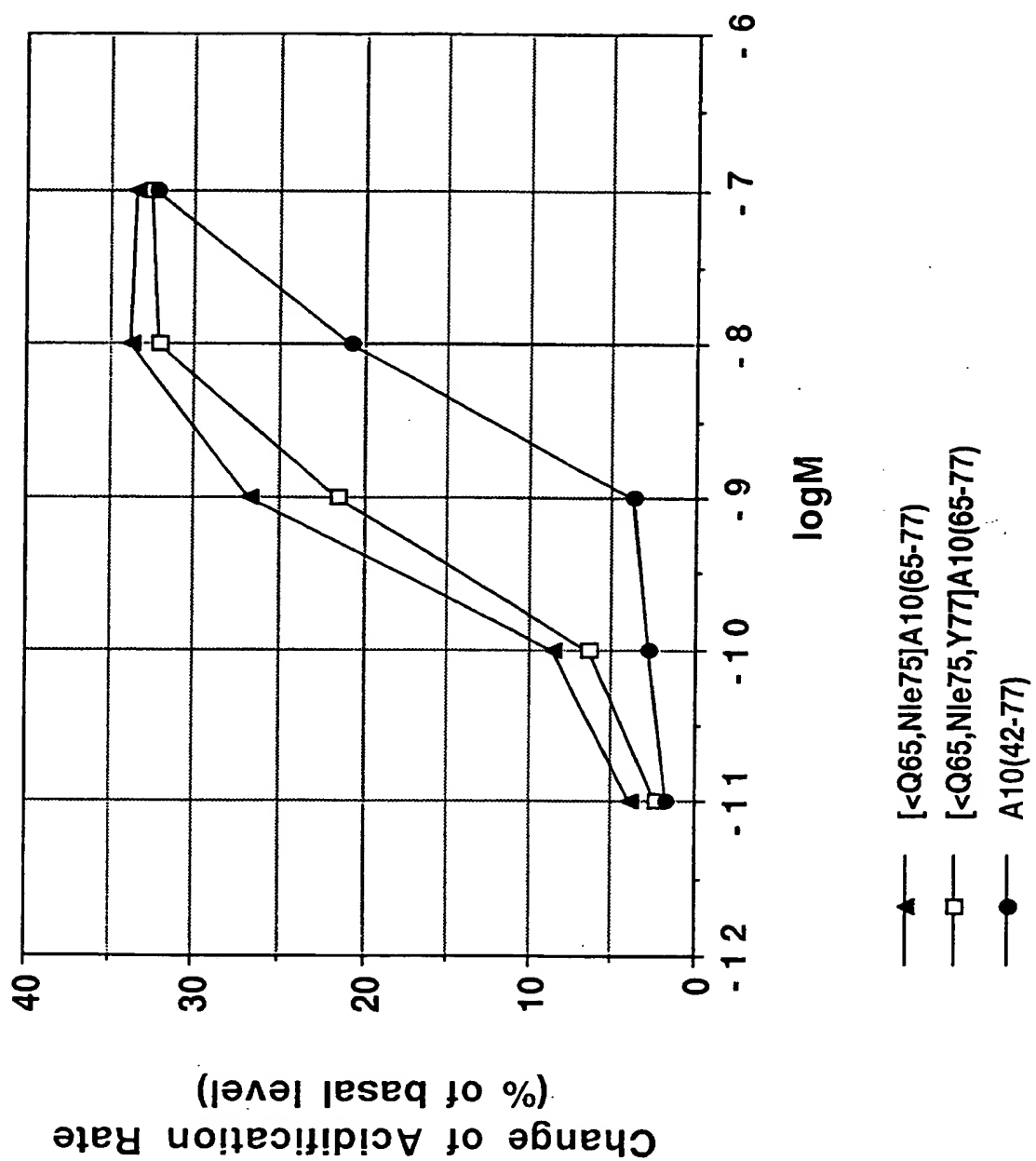
25. A^{16} および A^{17} がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である請求項12記載のアミノ酸残基またはペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

26. 請求項1記載のペプチドまたはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

27. 中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤または生殖器機能調節剤である請求項26記載の医薬。

28. 配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩の作用剤である請求項26記載の医薬。

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Peptide derivative

<130> 2549W00P

<150> JP 10-271626

<151> 1998-9-25

<160> 42

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa means Nle.

<400> 1

Leu Val Gln Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20 25 30

Pro Xaa Pro Phe

35

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa means Nle.

<400> 2

Leu Val Gln Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1 5 10 15
Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly
 20 25 30
Pro Xaa Pro Tyr
 35

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 3

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 4

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means

Nle.

<400> 5

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 6

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa

1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means Ac-Arg, Xaa on the 10th position means Nle.

<400> 7

Xaa Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means Ac-Arg, Xaa on the 10th position means

Nle.

<400> 8

Xaa Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means Ac-Arg, Xaa on the 10th position means Nle.

<400> 9

Xaa Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 8th position means Lys(Ac).

<400> 10

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 8th position means

Lys(Me).

<400> 11

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 8th position means
Lys(Ac), Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 12

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 8th position means
Lys(Me), Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 13

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 8th position means
Lys(Tos), Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 14

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 8th position means Arg(Tos), Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 15

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 5th position means Nle, Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 16

Xaa Arg Pro Arg Xaa Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 5th position means Nle, Xaa on the 11th position means Nle.

)

<400> 17

Xaa Arg Pro Arg Xaa Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means Nle, Xaa on the 13th position means Thi.

<400> 18

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Xaa

1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means Nle, Xaa on the 13th position means Phg.

<400> 19

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Xaa

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means Nle, Xaa on the 13th position means Pya(2).

<400> 20

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Xaa

1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 10th position means Nle.

<400> 21

Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Nle Pro Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 3rd position means Adi(NH₂), Xaa on the 34th position means Nle.

<400> 22

Leu Val Xaa Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20 25 30

Pro Xaa Pro Phe

35

<210> 23

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 3rd position means Lys(Ac), Xaa on the 34th position means

)



.

.

.

.

Nle.

<400> 23

Leu Val Xaa Pro Arg Thr Ser Arg Thr Gly Pro Gly Ala Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20 25 30

Pro Xaa Pro Tyr

35

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on 35th position means Nle.

<400> 24

Tyr Leu Val Lys Pro Arg Thr Ser Arg Thr Gly Pro Gly Ala Trp Gln

1 5 10 15

Gly Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys

20 25 30

Gly Pro Xaa Pro Phe

35

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means Z-pGlu, Xaa on the 8th position means
Lys(Ac), Xaa on the 11th position means Nle.

<400> 25

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10
<210> 26
<211> 380
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223>
<400> 26
Met Glu Glu Gly Gly Asp Phe Asp Asn Tyr Tyr Gly Ala Asp Asn Gln
1 5 10 15
Ser Glu Cys Glu Tyr Thr Asp Trp Lys Ser Ser Gly Ala Leu Ile Pro
20 25 30
Ala Ile Tyr Met Leu Val Phe Leu Leu Gly Thr Thr Gly Asn Gly Leu
35 40 45
Val Leu Trp Thr Val Phe Arg Ser Ser Arg Glu Lys Arg Arg Ser Ala
50 55 60
Asp Ile Phe Ile Ala Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Thr Phe Val Val
65 70 75 80
Thr Leu Pro Leu Trp Ala Thr Tyr Thr Tyr Arg Asp Tyr Asp Trp Pro
85 90 95
Phe Gly Thr Phe Phe Cys Lys Leu Ser Ser Tyr Leu Ile Phe Val Asn
100 105 110
Met Tyr Ala Ser Val Phe Cys Leu Thr Gly Leu Ser Phe Asp Arg Tyr
115 120 125
Leu Ala Ile Val Arg Pro Val Ala Asn Ala Arg Leu Arg Leu Arg Val
130 135 140
Ser Gly Ala Val Ala Thr Ala Val Leu Trp Val Leu Ala Ala Leu Leu
145 150 155 160

Ala Met Pro Val Met Val Leu Arg Thr Thr Gly Asp Leu Glu Asn Thr
165 170 175
Thr Lys Val Gln Cys Tyr Met Asp Tyr Ser Met Val Ala Thr Val Ser
180 185 190
Ser Glu Trp Ala Trp Glu Val Gly Leu Gly Val Ser Ser Thr Thr Val
195 200 205
Gly Phe Val Val Pro Phe Thr Ile Met Leu Thr Cys Tyr Phe Phe Ile
210 215 220
Ala Gln Thr Ile Ala Gly His Phe Arg Lys Glu Arg Ile Glu Gly Leu
225 230 235 240
Arg Lys Arg Arg Arg Leu Leu Ser Ile Ile Val Val Leu Val Val Thr
245 250 255
Phe Ala Leu Cys Trp Met Pro Tyr His Leu Val Lys Thr Leu Tyr Met
260 265 270
Leu Gly Ser Leu Leu His Trp Pro Cys Asp Phe Asp Leu Phe Leu Met
275 280 285
Asn Ile Phe Pro Tyr Cys Thr Cys Ile Ser Tyr Val Asn Ser Cys Leu
290 295 300
Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Phe Asp Pro Arg Phe Arg Gln Ala Cys
305 310 315 320
Thr Ser Met Leu Cys Cys Gly Gln Ser Arg Cys Ala Gly Thr Ser His
325 330 335
Ser Ser Ser Gly Glu Lys Ser Ala Ser Tyr Ser Ser Gly His Ser Gln
340 345 350
Gly Pro Gly Pro Asn Met Gly Lys Gly Gly Glu Gln Met His Glu Lys
355 360 365
Ser Ile Pro Tyr Ser Gln Glu Thr Leu Val Val Asp
370 375 380



<210> 27

<211> 1140

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223>

<400> 27

ATGGAGGAAG GTGGTGATTT TGACAACTAC TATGGGGCAG ACAACCAGTC TGAGTGTGAG	60
TACACAGACT GGAAATCCTC GGGGGCCCTC ATCCCTGCCA TCTACATGTT GGTCTTCCTC	120
CTGGGCACCA CGGGAAACGG TCTGGTGCTC TGGACCGTGT TTCGGAGCAG CCGGGAGAAG	180
AGGCGCTCAG CTGATATCTT CATTGCTAGC CTGGCGGTGG CTGACCTGAC CTTCGTGGTG	240
ACGCTGCCCC TGTGGGCTAC CTACACGTAC CGGGACTATG ACTGGCCCTT TGGGACCTTC	300
TTCTGCAAGC TCAGCAGCTA CCTCATCTTC GTCAACATGT ACGCCAGCGT CTTCTGCCTC	360
ACCGGCCTCA GCTTCGACCG CTACCTGGCC ATCGTGAGGC CAGTGGCCAA TGCTCGGCTG	420
AGGCTGCGGG TCAGCGGGGC CGTGGCCACG GCAGTTCTTT GGGTGCTGGC CGCCCTCCTG	480
GCCATGCCTG TCATGGTGTT ACGCACCACC GGGGACTTGG AGAACACCAC TAAGGTGCAG	540
TGCTACATGG ACTACTCCAT GGTGGCCACT GTGAGCTCAG AGTGGGCCTG GGAGGTGGGC	600
CTTGGGGTCT CGTCCACCAC CGTGGGCTTT GTGGTGCCCT TCACCATCAT GCTGACCTGT	660
TACTTCTTCA TCGCCCAAAC CATCGCTGGC CACTTCCGCA AGGAACGCAT CGAGGGCCTG	720
CGGAAGCGGC GCCGGCTGCT CAGCATCATC GTGGTGCTGG TGGTGACCTT TGCCCTGTGC	780
TGGATGCCCT ACCACCTGGT GAAGACGCTG TACATGCTGG GCAGCCTGCT GCACTGGCCC	840
TGTGACTTTG ACCTCTTCCT CATGAACATC TTCCCCTACT GCACCTGCAT CAGCTACGTC	900
AACAGCTGCC TCAACCCCTT CCTCTATGCC TTTTTCGACC CCCGCTCCG CCAGGCCTGC	960
ACCTCCATGC TCTGCTGTGG CCAGAGCAGG TGCGCAGGCA CCTCCCACAG CAGCAGTGGG	1020
GAGAAGTCAG CCAGCTACTC TTCGGGGCAC AGCCAGGGGC CCGGCCCCAA CATGGGCAAG	1080
GGTGGAGAAC AGATGCACGA GAAATCCATC CCCTACAGCC AGGAGACCCT TGTGGTTGAC	1140

<210> 28



<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 13th position means Met(0).

<400> 28

Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa

1 5 10 13

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 13th position means Nle.

<400> 29

Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Tyr

1 5 10 15

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 12th position means Phe(C1).

<400> 30

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Xaa

1 5 10 12

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 13th position means Phe(C1).

<400> 31

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Xaa

1 5 10 13

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 12th position means Nal(2).

<400> 32

Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Xaa

1 5 10 12

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 11th position means Nal(2).

<400> 33

Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Xaa

1 5 10 11

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 13th position means Phe(C1).

<400> 34

Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Xaa



1 5 10 13

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 11th position means Phe(C1).

<400> 35

Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Xaa

1 5 10 11

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 11th position means Cha.

<400> 36

Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Xaa

1 5 10 11

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 1st position means pGlu, Xaa on the 11th position means Cha.

<400> 37

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10 13

<210> 38

<211> 13



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 13th position means Cha.

<400> 38

Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa

1 5 10 13

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 15th position means Phe(C1).

<400> 39

Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Xaa

1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 10th position means Nle, Xaa on the 15th position means Phe(C1).

<400> 40

Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Met Pro Xaa

1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 10th position means Nle, Xaa on the 15th position means



Tyr(I).

<400> 41

Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Met Pro Xaa

1

5

10

15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Xaa on the 10th position means Nle, Xaa on the 15th position means
Tyr(Me).

<400> 42

Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Nle Gly Pro Met Pro Xaa

1

5

10

15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K 7/08, C07K 14/72, A61K 38/10, A61K 38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K 7/08, C07K 14/72, A61K 38/10, A61K 38/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 99/33976, A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 08 July, 1999 (08.07.99) & AU, 9916854, A	1-28
PX	Kazuhiko Tatemoto et al., "Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998), Vol. 251, No. 2, pages 471-476	1-28
A	Brain F. O'Dowd et al., "A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromos-ome 11.", Gene (1993), Vol. 136, No. 1/2, pages 355-360	1-28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 December, 1999 (08.12.99)

Date of mailing of the international search report
21 December, 1999 (21.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



3

4

5

6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07K 7/08, C07K 14/72, A61K 38/10, A61K 38/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07K 7/08, C07K 14/72, A61K 38/10, A61K 38/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO, 99/33976, A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 88. 7月. 1999 (08. 07. 99) & AU, 9916854, A	1 - 2 8
P X	Kazuhiko Tatemoto et al., "Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) Vol. 251, No. 2, p. 471-476	1 - 2 8
A	Brain F. O' Dowd et al., "A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11", Gene (1993) Vol. 136, No. 1/2, p. 355-360	1 - 2 8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 12. 99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



1
1
1

1
1
1

